

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ESTUDIO DE INHIBIDORES DE LA PROTEASA NS3-4A DEL VIRUS DE HEPATITIS C

TESIS

**Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS**

Presenta:

M. en C. ALEJANDRO DANIEL BERMÚDEZ-AGUIRRE

**Director de Tesis
Dr. EDGAR ZENTENO**

MÉXICO, DF

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este proyecto fue apoyado por la beca del CONACyT durante el periodo Agosto 2005 a Mayo 2009 (No. de registro 171978) y PAPIIT-UNAM (IN-212108), México.

Agradecimientos

A la UNAM y al CONACyT por hacer posible los estudios de Posgrado en México.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas reconocido como posgrado de excelencia a nivel internacional.

A la Facultad de Medicina y al departamento de Bioquímica de la UNAM.

Al laboratorio de virología del Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente del IMSS.

Al programa Universitario de Epidemiología, Genómica y Proteómica SDE1.PTID.05.1 de la UNAM.

Al Dr. Luis Padilla-Noriega por su invaluable aportación de conocimientos al presente trabajo.

Al Dr. Jaime Berumen-Campos, su apoyo fue decisivo para llevar a buen fin el proyecto.

Al Dr. Julio Reyes por su vocación para formar profesionistas.

Al Dr. Edgar Zenteno por su calidad humana y académica que hacen de él un excepcional científico.

A mi gran grupo de apoyo Leo, Luz Maria, Juan, Maya, Alinda, Sam, Vick.

A dos buenos amigos Edgar y Luis que me apoyaron siempre y en las mas difíciles, he aquí su contribución.

Índice	i
Índice de cuadros y figuras	iii
Lista de Abreviaciones	v
Abstract	1
Resumen	2
1. Introducción	3
1.1. Tratamiento antiviral	4
1.2. Biología molecular del VHC	4
1.3. Variantes genéticas del VHC	5
1.4. La proteasa de serina del VHC	6
1.5. Compuestos inhibidores de la proteasa NS3-4A	8
1.6. Modelos de estudio de la biología molecular del VHC	9
1.6.1. Métodos de estudio de la proteasa NS3-4A	10
2. Hipótesis	12
3. Objetivos	12
4. Metas	12
5. Material y métodos	13
5.1. Obtención de los genes del VHC	13
5.1.1. Clonación de los genes del VHC	14
5.1.2. Obtención de la región específica de los genes del VHC	14
5.2. Análisis de secuencia de los genes del VHC	14
5.3. Construcción de variantes de NS4A ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3 ₍₁₋₁₈₁₎	15
5.4. Construcción de la secuencia nucleotídica para la variante NS3 ₍₁₋₆₃₁₎ -NS4Am2 30-32 ₍₁₋₅₄₎	16
5.5. Construcción de la secuencia de expresión para proteína NS5AB ₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎ y las variantes de NS3	17
5.6. Expresión y purificación de proteínas	17
5.7. Ensayo de actividad proteolítica	18
5.8. Análisis de la colección de secuencias de la proteína NS4A del VHC	18
6. Resultados	19
6.1. Variantes de la proteína NS4A del VHC	19
6.2. Análisis del efecto de las variantes de NS4A sobre la actividad de proteasa de NS3-4A del VHC-dh	19
6.2.1. Expresión de la proteína NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-dh	20
6.2.2. Expresión de la proteína NS5AB ₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎	22
6.2.3. Expresión de variantes del complejo NS4A ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-dh	23
6.2.4. Actividad proteolítica de variantes del complejo NS4A ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-dh	25

6.2.5. Comparación de las características estructurales de la región 21-32 de las variantes NS4Awt y NS4Am2	27
6.2.5.1. Expresión de variantes derivadas de NS4Am2	27
6.2.5.2. Actividad proteolítica de las variantes derivadas de NS4Am2	30
6.3. Análisis del efecto de la variante NS4Am2 sobre la actividad proteolítica de la NS3-4A del VHC-1b	30
6.3.1. Variantes de la proteína NS3 del VHC	30
6.3.2. Expresión de la proteína NS3_1b ₍₁₋₁₈₁₎	32
6.3.3. Obtención de variantes del complejo NS4A ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-1b	32
6.3.4. Actividad proteolítica de variantes del complejo NS4A ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-1b	34
6.4. Obtención de variantes de la proteína completa NS3 ₍₁₋₆₃₁₎ -4A ₍₁₋₅₄₎ del VHC-dh	34
6.4.1. Actividad proteolítica de variantes de la proteína completa NS3 ₍₁₋₆₃₁₎ -4A ₍₁₋₅₄₎	39
6.5. Determinación de las características de la proteína NS4A que limitan la actividad de proteasa de NS3-4A del VHC	41
6.5.1. Diseño de la variante NS4Awt 24	44
6.5.2. Obtención de la variante NS4Awt 24 ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3_1b ₍₁₋₁₈₁₎	44
6.5.3. Actividad proteolítica de NS4Awt 24 ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3_1b ₍₁₋₁₈₁₎	46
7. Discusión	48
8. Conclusiones	53
9. Perspectivas	53
10. Referencias Bibliográficas	54
11. Anexos	64
11.1. Secuencia de iniciadores	64
11.2. Marcadores de masa molecular	66
11.3. Publicaciones derivadas de la tesis doctoral	67

Índice de cuadros y figuras

Cuadro 1. Principales variantes del virus de Hepatitis C.	6
Cuadro 2. Aminoácidos de NS3 que favorecen su resistencia a fármacos antivirales.	8
Cuadro 3. Grupo de proteínas expresadas con la proteasa NS3 del VHC-dh y variantes de NS4A.	24
Cuadro 4. Análisis ClustalW entre las secuencias de NS3 obtenidas.	31
Cuadro 5. Secuencia de las variantes de NS4A fusionadas a la proteína NS3 del VHC-1b.	35
Cuadro 6. Secuencias representativas de la región 21-32 de la proteína NS4A de diferentes subtipos de VHC.	42
Figura 1. Procesamiento de la poliproteína viral por el complejo serin-proteasa NS3-4A.	5
Figura 2. Representación esquemática del complejo de serin-proteasa NS3-4A.	7
Figura 3. Estrategia de construcción de variantes de la cadena única de aminoácidos NS4AX ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ .	16
Figura 4. Predicción de la secuencia de aminoácidos de tres variantes de NS4A.	19
Figura 5. Obtención de la secuencia para la proteína NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ .	20
Figura 6. Traducción <i>in silico</i> de la secuencia para la proteína NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-dh.	21
Figura 7. SDS-PAGE de las proteínas expresadas.	22
Figura 8. Obtención de la secuencia para la proteína NS5AB ₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎ .	23
Figura 9. Secuencia NS4Awt ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ .	24
Figura 10. Obtención de la variante NS4Am2 ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ .	25
Figura 11. Actividad enzimática de variantes de la cadena única usando la secuencia NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-dh.	26
Figura 12. Esquema de las características calculadas por el método de Chou & Fasman de variantes de NS4A.	28
Figura 13. Construcción de la variante NS4Am2 30-32 ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ .	29
Figura 14. Obtención de la variante NS4A 23,25 ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ .	29
Figura 15. Secuencia de la proteína NS3_1b ₍₁₋₁₈₁₎ .	31
Figura 16. Obtención de la proteína NS3_1b ₍₁₋₁₈₁₎ .	32
Figura 17. Secuencia obtenida para la variante NS4Awt ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3_1b ₍₁₋₁₈₁₎ .	33
Figura 18. Obtención de la secuencia para NS4Am2 ₍₂₁₋₃₂₎ -GSGS-NS3_1b ₍₁₋₁₈₁₎ .	33
Figura 19. Actividad enzimática de variantes de cadena única usando la secuencia NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-1b.	35
Figura 20. Obtención de la secuencia NS3 ₍₁₋₆₃₁₎ -4Awt ₍₁₋₅₄₎ .	36
Figura 21. SDS-PAGE de las proteínas expresadas con la secuencia completa de NS3-4A.	37
Figura 22. Secuencia de la variante NS3 ₍₁₋₆₃₁₎ -4Am2 ₍₁₋₅₄₎ .	38

Figura 23. Obtención de la secuencia para NS3 ₍₁₋₆₃₁₎ -4Am2 30-32 ₍₁₋₅₄₎ .	39
Figura 24. Actividad enzimática de variantes de NS3 ₍₁₋₆₃₁₎ -4A ₍₁₋₅₄₎ .	40
Figura 25. Esquema del análisis de predicción estructural GOR-Threading de diferentes subtipos de NS4A.	44
Figura 26. Esquema del análisis de predicción estructural GOR-Threading de las variantes de NS4A expresadas.	45
Figura 27. Obtención de la variante NS4Awt 24 ₍₂₁₋₃₂₎ -NS3_1b ₍₁₋₁₈₁₎ .	46
Figura 28. Actividad enzimática de las variantes NS4Awt, NS4Am2 y NS4Awt 24 unidas a la secuencia de NS3_1b del VHC-1b.	47

Lista de Abreviaciones

a.a.	aminoácido
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
h	hora
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani
min	minuto
NS	No estructural (Non-structural)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (Poly Acrilamide Gel Electroforesis)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction)
RT	Retro-trascrición (Retro-transcription)
s	segundo
SDS	dodecilsulfato de sodio (Sodium Dodecil Sulfate)
VHC	virus de hepatitis C

Abstract

The Hepatitis C virus (HCV) is a compelling human health problem causing cirrhosis and hepatic cancer. The non-structural protein NS3 and NS4A of the HCV forms the NS3-4A serin-protease complex which processes the viral polyprotein. Thus the NS3-4A serin-protease complex represents a key target in development of antiviral strategies against VHC. NS4A joints to NS3 through a specific central region sequence (amino-acids 21-32) thus enhance the protease activity of NS3-4A. In this work two NS3-4A variants from blood samples with HCV were determined, this NS3-4A variants shows low protease activity and differ at the NS4A central region sequence. The effect of the changes in NS4A sequence was assayed expressing variants of the NS3-4A protein. The protease activity of NS3-4A variants were assayed *in vitro* using as substrate the NS5AB protein which represents the NS5A/NS5B viral polyprotein junction. Specific differences were determined in the NS3-4A variants with low protease activity representing a structural modification in the beta-strand NS4A structure. These results were confirmed by building the NS4Am2 23,25 and NS4Awt 24 variants with a shorter beta-strand than know NS4A variants. When NS4Am2 23,25 or NS4Awt 24 are expressed joined to NS3 the proteolytic activity of the expressed protein is decreased. The data generated about NS4A central region may help in developing more effective antiviral strategies against the NS3-4A of the VHC.

Resumen

La infección por virus de hepatitis C (VHC) representa un problema de salud mundial ya que origina cirrosis y cáncer hepático. Las proteínas no estructurales NS3 y NS4A del VHC forman el complejo NS3-4A con actividad de proteasa de serina. Esta actividad es clave en el proceso replicativo del VHC ya que procesa la poliproteína viral permitiendo la maduración de proteínas indispensables para la replicación de nuevas partículas virales. Por tanto, NS3-4A representa un punto clave para el desarrollo de estrategias antivirales más efectivas. La proteína NS4A posee una secuencia específica en su región central (aminoácidos 21-32) la cual es determinante para unirse a NS3 e incrementar la actividad proteolítica de NS3-4A. En el presente trabajo se determinaron dos variantes de NS3-4A en muestras de sangre infectada con VHC las cuales presentan baja actividad proteolítica y difieren de otras previamente reportadas en la secuencia de la región central de NS4A. El efecto de las diferencias en NS4A se analizó expresando variantes de la secuencia de NS3-4A. La actividad proteolítica de las proteínas expresadas se analizó *in vitro* usando como sustrato la proteína NS5AB que representa la región de corte NS5A/NS5B de la poliproteína viral. Se determinó que las variantes de NS3-4A con baja actividad proteolítica presentan cambios particulares en la secuencia de NS4A que modifican la estructura tipo beta plegada que esta proteína forma. Esta información se comprobó construyendo las variantes NS4Am2 23,25 y NS4Awt 24 que presentan en común una estructura beta plegada mas corta que las variantes conocidas de NS4A. La expresión de NS4Am2 23,25 o NS4Awt 24 unida a NS3 limita la actividad proteolítica de NS3-4A. Los datos generados sobre la región central de NS4A pueden contribuir al diseño de estrategias antivirales más efectivas contra la proteasa NS3-4A del VHC.

1. Introducción

El virus de hepatitis C (VHC) fue caracterizado molecularmente en 1989 por Choo y cols. cuando se logró clonar y secuenciar parte del genoma viral, lo cual permitió el desarrollo de pruebas específicas que identificaron a este virus como el agente causante de lo que hasta entonces era denominado como Hepatitis no A no B (Hepatitis NANB). Este virus se transmite por contacto directo con sangre infectada por lo que existen grupos de alto riesgo relacionados principalmente con: falta de infraestructura adecuada para la detección del patógeno en productos sanguíneos; desinformación entre individuos jóvenes o personas asintomáticas que intercambian agujas hipodérmicas; personas con enfermedades como la hemofilia que representa la transfusión de sangre posiblemente contaminada antes de haber sido estandarizada la determinación de hepatitis C en los bancos de sangre (Houghton & Abrignani; 2005).

En México la principal fuente de contagio es el intercambio de agujas hipodérmicas y los tatuajes con material no desechable; se calcula que entre el 1.2% y 1.8% de la población mexicana esta infectada con el VHC y en el mundo hay aproximadamente 200 millones de personas infectadas, provocando un promedio de 100,000 muertes al año por el VHC. (De Andrade & De Andrade 2004; Pawlotsky, 2004; Valdespino y cols. 2007). El VHC provoca distintos grados de infección en el individuo, algunos pacientes (menos del 20%) llegan a resolver la infección de manera natural mientras que los pacientes con infección crónica desarrollan cirrosis en el 20% de los casos y carcinoma hepático en el 5% (Pawlotsky, 2004; Kershenobich-Stalnikowitz y cols. 2007). Los procesos virales que causan el daño hepático no han sido completamente entendidos. Aunque el VHC no integra su material genético al celular, existen otros factores que aceleran la atrofia del hígado como la acumulación de hierro que causa esta infección y resulta hepatotóxica, el consumo de alcohol, la respuesta inmune inespecífica contra el VHC que permanece por años provocando inflamación persistente, infecciones virales asociadas a la hepatitis C como la hepatitis B o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, el sobrepeso, diabetes, hipertensión, entre otros. (Pawlotsky, 2004; Gutiérrez-Reyes y cols. 2007; Miura y cols. 2008).

La infección por VHC también provoca en poco más de la mitad de los casos (40%-74%), una o varias manifestaciones extrahepáticas (MEH) como los tipos II y III de crioglobulinemia mixta; de tipo endocrino como hipotiroidismo y diabetes; reumatológicas como artritis que se presenta durante el proceso inmune asociado con la crioglobulinemia y otros padecimientos como osteoesclerosis, cardiomiopatía hipertrófica y fibrosis pulmonar. Estas MEHs son importantes ya que pueden ser la primera señal de infección por VHC en pacientes de alto riesgo que no presentan síntomas hepáticos, pues los tejidos susceptibles a MEHs actúan como reservorios de partículas virales (Galossi y cols. 2007).

1.1. Tratamiento antiviral

Aunque la detección temprana de anomalías hepáticas es determinante en la respuesta al tratamiento, la infección por VHC generalmente se trata con interferón- α (INF- α) pegilado ([INF- α 2b) a dosis de 1.5 μ g/Kg/semana, complementado con 1 g/día Ribavirina, sin embargo esta terapia doble no logra una respuesta antiviral sostenida (SVR, por sus siglas en inglés Sustained Virological Response), la cual se determina cuando el ARN viral en sangre permanece debajo del nivel detectable 6 meses después de terminado el tratamiento. La SVR solo se logra en aproximadamente el 45% de los pacientes infectados con el tipo 1 del VHC (Pawlotsky, 2004; Houghton & Abrignani 2005; Taylor y cols. 2005). Esto puede explicarse parcialmente porque el tratamiento es inespecífico ya que a pesar de que el INF- α induce la transcripción de más de 200 genes, solo unos cuantos participan en la respuesta antiviral. La función antiviral del INF- α consiste en limitar la replicación del virus a través de la desaminasa de adenosina de ARN de doble cadena (ADAR1) y causar la fosforilación del factor de inicio de la transcripción (eIF2) lo cual al impedir la asociación eIF2-GTP-met-tARN, suprime la transcripción y traducción de cualquier ARNm (Taylor y cols., 2005). Por su parte la Ribavirina es un análogo nucleotídico por lo que induce mutaciones en toda secuencia nucleotídica (celular o viral) que sea transcrita en la célula medicada, lo que muestra también una acción inespecífica contra el VHC. El tratamiento doble es poco tolerado debido a su alta toxicidad y porque el largo periodo de administración requerido (48 semanas para el genotipo 1) comúnmente genera en el paciente anemia, problemas pulmonares y de la tiroides, depresión, fatiga, entre otros (Manns y cols. 2006; Kershenobich-Stalnikowitz y cols. 2007). La administración de Timalfasina (1.6 mg/semana) junto con el tratamiento doble promueve una SVR en el 23.5% de los pacientes con el genotipo 1 del VHC que no responden a la terapia doble (Poo y cols. 2008).

1.2. Biología molecular del VHC

El VHC está clasificado en la familia *Flaviviridae* por ser un virus envuelto en una capa lipídica y presentar una cadena sencilla de ARN en sentido positivo. Debido a características poco comunes como su alta variabilidad genética y la enzima multifuncional NS3, se creó el género *Hepacivirus* para distinguirlo de otros flavivirus (Choo y cols. 1991; Kim y cols. 1996; Giannini & Bréchet, 2003). El ARN viral codifica una poliproteína de aproximadamente 3010 aminoácidos C(F)/E1/E2/p7/NS2/NS3/NS4A/NS4B/NS5A/NS5B la cual al ser procesada por proteasas del hospedero genera las proteínas de la estructura viral: C, E1, E2 y p7, estas proteínas forman la cápside o núcleo viral (C), la envoltura de la partícula (E1 y E2) y p7 que se ha sugerido, interviene en la liberación del genoma durante la infección al formar canales iónicos en la envoltura viral. Se ha propuesto además la existencia de un segundo marco de lectura (ORF1b) que provoca la síntesis de la proteína F y una variante de la proteína C (Kato 2001; Dubuisson 2007).

Las proteínas no estructurales NS2/NS3/NS4A/NS4B/NS5A/NS5B se relacionan con el proceso de replicación y son procesadas por 2 enzimas virales, NS2 y NS3. NS2 es una metaloproteína

dependiente de Zn^{+} que genera un corte autocatalítico en la región NS2/NS3 de la poliproteína viral, de igual forma la proteasa de serina NS3 genera un corte en la región NS3/NS4A y permite la asociación no covalente NS3-4A. El complejo serin-proteasa NS3-4A, procesa el resto de la poliproteína viral (NS4B/NS5A/NS5B) provocando la maduración de las proteínas NS4B, NS5A y NS5B. La función de la proteína NS4B aun no ha sido demostrada plenamente, mientras que a NS5A se le atribuye función de fosfoproteína y a NS5B función de polimerasa de ARN dependiente de ARN (Kim y cols. 1996; Pawlotsky, 2004; Lindenbach & Rice, 2005; Dubuisson, 2007) (Figura 1).

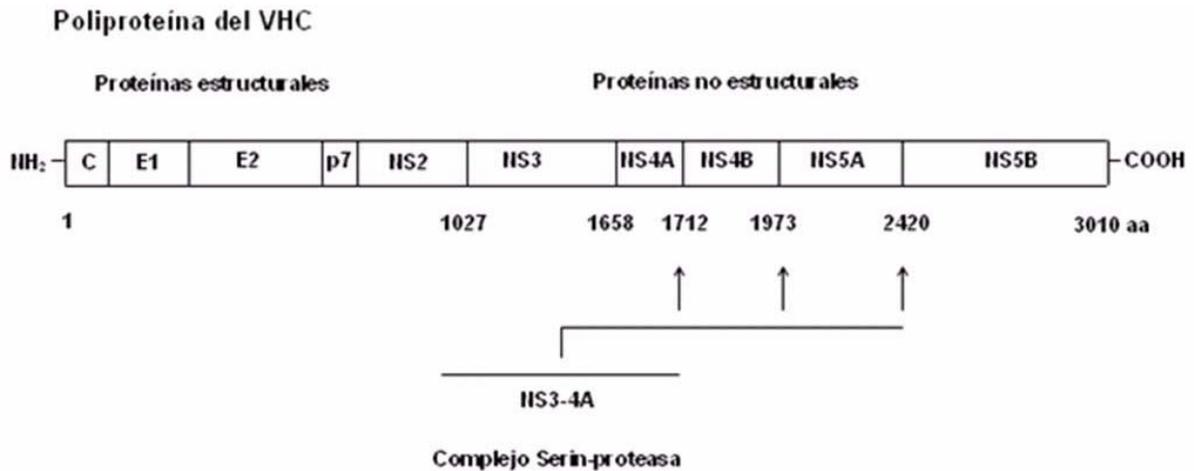


Figura 1. Procesamiento de la poliproteína viral por el complejo serin-proteasa NS3-4A. Los sitios de corte en la poliproteína viral se indican con divisiones verticales y las flechas indican aquellos procesados por NS3-4A. El sitio de corte NS3-NS4A es procesado en *cis* por NS3. aa, aminoácido.

1.3. Variantes genéticas del VHC

Este virus genera aproximadamente 10^{12} copias diarias en el hospedero además posee un alta variabilidad genética (aproximadamente $1.4 \times 10^3 - 1.9 \times 10^3$ sustituciones/nucleótido/año) que se debe a la sustitución nucleotídica que ocurre durante el proceso replicativo y a la falta de actividad de exonucleasa de la polimerasa viral que impide la corrección de errores en la secuencia replicada; esta variabilidad en el genoma del VHC se ha propuesto como el origen de variantes dominantes, las cuales al presentar diferencias clave en las proteínas que codifican, les confieren resistencia al fármaco antiviral. (Pawlotsky, 2003; Wang y cols. 2004; Guillou-Guillemette y cols. 2007; Qi y cols. 2009). La variabilidad genética del VHC se ha clasificado en grupos principales o Tipos y en Subtipos (a,b,c...) (Cuadro 1). Se han identificado variantes genéticas del VHC altamente resistentes al tratamiento antiviral, como el VHC-1b para el cual el tratamiento resulta ineficiente en más de la mitad de los casos siendo este subtipo el que predomina en México (Chayama y cols. 1997; Vallet y cols. 2005; Dehesa-Violante y cols. 2007; Guillou-Guillemette y cols. 2007; Gottwein y cols. 2009).

Cuadro 1. Principales variantes del virus de Hepatitis C. Diferentes subtipos de VHC predominan en regiones específicas del mundo.

Tipo	Subtipo	Región
1	b	América (México)
1	a	América
1	variable	Europa
2	variable	Europa
2	i	Asia
2	c hasta m	África
3	variable	Europa
4	b	África
4	c	África
4	e	África
4	m	África
6	p	Asia

Es interesante hacer notar que la variabilidad del genoma del VHC no es uniforme, ya que existen regiones de su secuencia que presentan una variabilidad de más del 50% como la secuencia de las proteínas NS4B, NS5A y las regiones hipervariables 1 y 2 de la proteína E2, mientras que otras son muy conservadas como la región que codifica la proteína C, la enzima NS3 y los extremos 5' y 3' no traducibles (NTR) de la cadena del ARN viral (Chayama y cols. 1997; Vallet y cols. 2005; Guillou-Guillemette y cols. 2007). Otra característica particular del genoma del VHC es la presencia de una región específica que parece determinar la sensibilidad del virus al tratamiento con interferón conocida por sus siglas en inglés como ISDR (Interferon Sensitive Determinant Region) (Chayama y cols. 1997).

1.4. La proteasa de serina del VHC

NS3 es una enzima con doble función ya que en el extremo N-terminal posee actividad de proteasa de serina que interviene en el procesamiento de la poliproteína viral y el resto de su estructura posee función de helicasa de ARN que revierte el enrollamiento de las cadenas dobles de ARN formadas durante la replicación de la cadena lineal (Kim y cols. 1996; Penin 2003; Lindenbach & Rice 2005). Los primeros 181 aminoácidos de la proteína NS3 forman un plegamiento típico de la familia de quimiotripsina compuesto por dos estructuras tipo beta-barril con actividad de proteasa de serina siendo esta actividad incrementada por la unión de la proteína NS4A (Kim y cols. 1996; Yan y cols. 1998).

NS4A es una proteína anfipática de 54 residuos, que se asocia con los primeros 40 aminoácidos de NS3 (Kim y cols. 1996). Los análisis de cristalografía de NS3-4A han mostrado que la secuencia hidrófoba que corresponde a la región central de NS4A forma una estructura tipo beta plegada con la cual NS4A se une a la proteasa incrementando su actividad proteolítica (Bartenschlager y cols. 1995; Lin y cols. 1995; Tanji y cols. 1995; Kim y cols. 1996; Shimizu y cols. 1996). El efecto de la estructura beta plegada de NS4A se debe a que su asociación ordena los aminoácidos del extremo N-terminal de NS3 formando dos estructuras nuevas (h ($\alpha 0$) y β ($A0$)) y optimiza el alineamiento del aminoácido 81 en la triada catalítica H57, D81, S139 (Kim y cols. 1996; Bartenschlager 1999; Penin 2003) (Fig. 2).

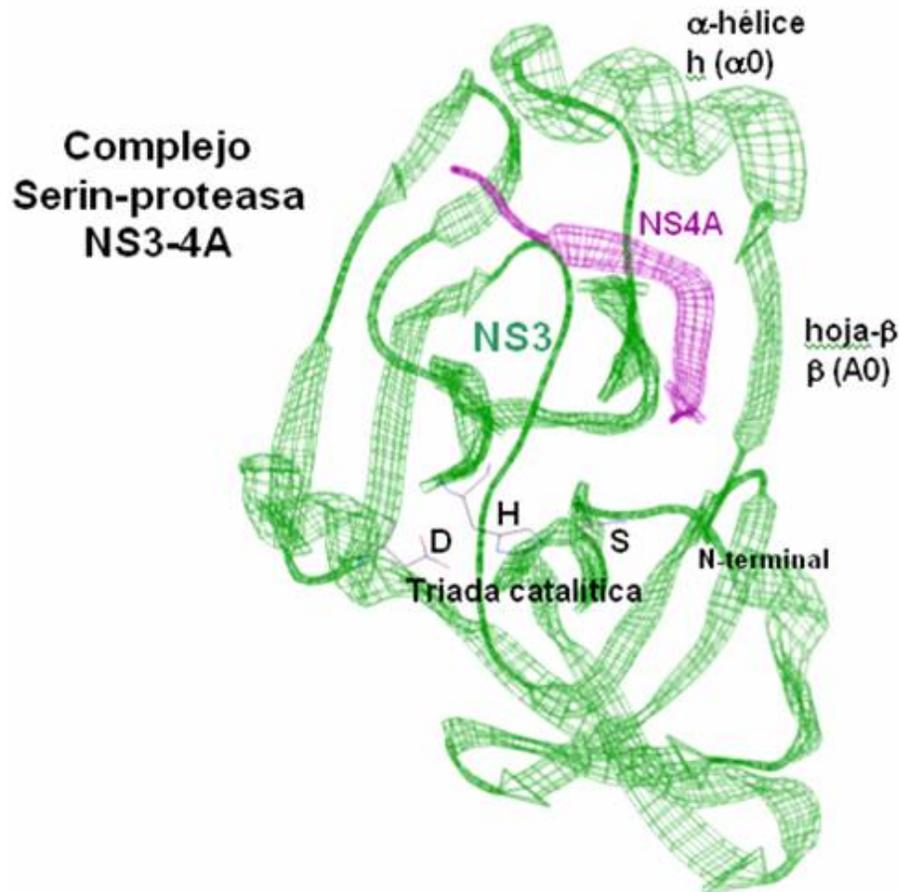


Figura 2. Representación esquemática del complejo de serin-proteasa NS3-4A. La estructura beta plegada que forman los aminoácidos 21-32 de la proteína NS4A se muestra complementando la estructura beta-barril del dominio de proteasa (res. 1-181) de la proteína NS3.

La actividad de proteasa de NS3 representa un proceso clave en la replicación del VHC ya que provoca la maduración de las proteínas no estructurales que participan en el proceso replicativo. El procesamiento del sitio de corte NS5A/NS5B de la poliproteína viral produce la maduración de la proteína NS5B, esta proteína es indispensable para la replicación de nuevas secuencias del virus ya

que actúa como polimerasa de ARN. Ya que no existe una proteína humana capaz de replicar secuencias de ARN, la maduración de NS5B por la actividad proteolítica de NS3-4A es considerada uno de los principales puntos de acción contra la infección por VHC (Hamill & Jean 2005; Li y cols. 2006; Beran & Pyle 2008; Ismail y cols. 2008).

1.5. Compuestos inhibidores de la proteasa NS3-4A

Aunque la proteasa NS3 posee características similares a otras enzimas con plegamientos de tipo quimiotripsina, esta proteína presenta diferencias estructurales que se han propuesto como el origen de que los inhibidores de quimiotripsina no tengan efecto. La diferencia principal de NS3 son las estructuras tipo asa que en las quimiotripsinas se intercalan entre las cadenas beta de la estructura principal; sin embargo en NS3 estas asas no existen o son más cortas de lo normal lo que impide la interacción del inhibidor con la estructura de la proteasa (Kim y cols. 1996).

Hasta hace poco tiempo la secuencia de la proteína NS3 se consideraba prácticamente invariable aún entre los distintos subtipos del VHC por lo que se diseñaron inhibidores en base a la estructura cristalizada de NS3 (PDB acceso número: 1A1R, 1NS3). Algunos de ellos son inicialmente efectivos pero pierden paulatinamente su efecto; recientes reportes han mostrado mutaciones específicas en la secuencia de NS3 que le confieren resistencia al fármaco utilizado (Cuadro 2) (Vallet y cols. 2005; Dahl y cols. 2007; Guillou-Guillemette y cols. 2007; Wohnsland y cols. 2007; Qi y cols 2009).

Cuadro 2. Aminoácidos de NS3 que favorecen su resistencia a fármacos antivirales.

Aminoácido sustituido	Inhibidor	Referencia
V36M/A, T54A, R155K/T, A156V/T	Telaprevir (VX-950)	Lin y cols. 2004 Gentile y cols. 2009 Hézode y cols. 2009 Lin y cols. 2009 McHutchison y cols. 2009 Qi y cols. 2009
R155K, A156S/V, D168A/V/E	ITMN-191	Seiwert y cols. 2006 Qi y cols. 2009 Rajagopalan y cols. 2009
T54A, A156S/T, V170A	Boceprevir (SCH-503034)	Tong y cols. 2006 Bogen y cols. 2009 Mederacke y cols. 2009

Existen otros fármacos con diferente grado de éxito como el TMC-435350 que ha mostrado resultados favorables (Lin y cols. 2009) o BILN-2061 que actualmente se replantea su desarrollo ya que la fase de experimentación *in vivo* en monos mostró toxicidad en tejido cardíaco (Vanwollegem y cols. 2007).

La proliferación de variantes resistentes al tratamiento ha replanteado la estrategia antiviral hacia una terapia a base de varios fármacos con distinto modo de acción, estas terapias combinadas pueden retrasar o prevenir la selección de variantes resistentes, por lo que el desarrollo de diversas moléculas que limiten la replicación del VHC es importante (Villano y cols. 2006; Delang y cols. 2009; Gaudieri y cols. 2009). Los avances en biología molecular actualmente permiten el desarrollo de pequeñas moléculas que actúan sobre proteínas específicas del ciclo replicativo del VHC, esta técnica conocida como STAT-C por sus siglas en inglés (Specifically Targeted Antiviral Therapy for HCV) ha mostrado resultados favorables contra la infección por Hepatitis B y VIH (Clavel & Hande 2004; Locarnini & Warner 2007).

La secuencia de la región central de NS4A es altamente conservada entre los subtipos de VHC lo cual indica su trascendencia en la preservación de la misma, previamente se ha observado que existe relación entre cambios específicos en esta región y la función de la proteasa NS3 induciendo incluso su autoproteólisis (Butkiewicz y cols. 1996; Kou y cols. 2007; Hou y cols. 2009), esto sugiere que la relación funcional entre NS3 y NS4A puede ser manipulada con fines antivirales. El sitio de corte NS5A/NS5B es determinante en la replicación del VHC ya que libera la polimerasa viral NS5B cuando es procesado por NS3-4A. A diferencia de otras proteínas procesadas por NS3-4A, de las que actualmente se discute su participación en el ciclo replicativo del VHC, la función de polimerasa viral de NS5B ha sido verificada en diversos trabajos (Failla y cols. 1994; Bartenschlager y cols. 1995; Gallinari y cols. 1999; Macdonald & Harris 2004; Lindenbach & Rice 2005). Por lo tanto, el estudio de variantes de la proteína NS4A del VHC con efecto inhibitor de la función de proteasa de serina de NS3-4A en el sitio de corte NS5A/NS5B, puede contribuir en el desarrollo de estrategias antivirales más efectivas contra el VHC. Se ha demostrado en otras especies de flavivirus que la modificación de la proteína accesoria, en este caso la NS4A del VHC, desestabiliza la interacción con la proteasa llegando a bloquear por completo la capacidad infecciosa del virus (Preugschat y cols. 1990; Falgout y cols. 1991; Chambers y cols. 1993; Lin y cols. 1993).

1.6. Modelos de estudio de la biología molecular del VHC

El estudio del VHC ha sido lento, ya que la replicación de este virus es particularmente restrictiva a un reducido grupo de tipos celulares impidiendo el desarrollo de un modelo animal o celular que genere una tasa replicativa experimentalmente útil (Ikeda y cols. 2005; Wakita y cols. 2005; Windisch y cols. 2005; Rychlowska & Bienkowska-Szewczyk 2007). Se han realizado estudios inmunológicos en el modelo de chimpancé; sin embargo, se ha cuestionado su validez ya que al parecer la

respuesta inmune que presenta es diferente de la humana (Pawlotsky 2004). Se han desarrollado variantes del modelo de replicación basado en la línea celular de hepatocitos humanos (Huh-7), este modelo consiste en fragmentos autoreplicantes de un subtipo específico del VHC que expresa las proteínas que intervienen en la replicación viral (Lohmann y cols. 1999; Ikeda y cols. 2005; Sarrazin y cols. 2005; Wakita y cols. 2005; Gottwein y cols. 2009). Variantes del modelo de replicación han permitido estudiar aspectos importantes del ciclo replicativo del VHC debido a la alta tasa replicativa que genera, sin embargo este modelo impide estudiar la relación entre variantes específicas del VHC y la función de sus proteínas ya que esta basado en una secuencia en particular que además de ser optimizada en el laboratorio para favorecer su replicación también genera mutaciones de tipo adaptativo a la línea celular, lo que produce los niveles replicativos reportados (Abe y cols. 2007; Qi y cols. 2009). El replicón construido con la secuencia viral JFH1 obtenida de un paciente con hepatitis C fulminante impide saber si las características que muestra representan aspectos generales del VHC o son particulares de esta secuencia (Wakita y cols. 2005).

1.6.1. Métodos de estudio de la proteasa NS3-4A

Existen metodologías variadas para estudiar la actividad de proteasa de NS3-4A las cuales han mostrado que la expresión de la secuencia completa de NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎ en células eucariontes genera una proteína con una relación proceso/rendimiento poco útil (Sali y cols. 1998; Taremi y cols. 1998); así mismo los análisis enzimáticos de la proteína NS3 suplementada *en trans* con NS4A origina una ineficiente interacción entre estas provocando una actividad proteolítica alterada o limitada (Sato y cols. 1995; Shimizu y cols. 1996; Steinkühler y cols. 1996; Morgenstern y cols. 1997; Sali y cols. 1998; Taremi y cols. 1998; Beran & Pyle 2008). Una alternativa ha sido expresar en células *E. coli* una cadena única de aminoácidos formada por la región mínima de NS4A (aminoácidos 21-32) que incrementa la actividad proteolítica de NS3 y los primeros 181 aminoácidos de NS3 que forman el dominio de proteasa. Ambas secuencias están unidas a través de 2 ó 4 aminoácidos que generan un asa en la cadena única de aminoácidos (NS4A₍₂₁₋₃₂₎-ASA-NS3₍₁₋₁₈₁₎) y provocan la unión de NS4A con la proteasa de un modo muy similar que en el complejo natural NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎. Así mismo la cadena única de aminoácidos puede ser expresada en altas concentraciones como una proteína soluble (Kim y cols. 1996; Dimasi y cols. 1998; Taremi y cols. 1998; Thibeault y cols. 2009).

Los modelos de cadena única desarrollados difieren principalmente en la secuencia del asa de unión entre NS4A y NS3. El primer modelo fue desarrollado por Taremi y cols. en 1998 usando el asa GSGS la cual se determinó por cálculos de minimización de energía que favorece su formación a menor coeficiente energético; además, se seleccionó de una serie de variantes de cadena única expresadas con distintas secuencias de asa comparando sus parámetros enzimáticos con los de la proteína completa NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎. El modelo desarrollado por Dimasi y cols. (1998) se propuso después con un asa seleccionada de un grupo de secuencias conocidas que producen esta

formación. El modelo de cadena única desarrollado por Taremi y cols. 1998 ha probado ser eficiente para el estudio de la NS3-4A del VHC así como para otros flavivirus y presenta características enzimáticas similares a las del complejo natural (Sali y cols. 1998, Taremi y cols. 1998; Sardana y cols. 1999; Lai y cols. 2000; Leyssen y cols. 2000; Kou y cols. 2007).

En el presente proyecto se estudió la utilidad de secuencias modificadas de NS4A como inhibidores de la actividad proteolítica de NS3-4A del VHC por el método de cadena única y se determinó la existencia de variantes del VHC con actividad proteolítica diferente sobre el sitio de corte NS5A/NS5B de la poliproteína viral.

2. Hipótesis

La modificación de la estructura de la región central de la proteína NS4A limita la actividad proteolítica de NS3-4A del VHC.

3. Objetivos

ESTUDIO DE INHIBIDORES DE LA PROTEASA NS3-4A DEL VIRUS DE HEPATITIS C

- Analizar las variantes de la proteína NS4A provenientes del aislado de VHC-dh y su efecto sobre la actividad de proteasa de NS3-4A del VHC-dh.
- Comparar el efecto de las variantes de la proteína NS4A del VHC-dh sobre la actividad de proteasa de NS3-4A del VHC-1b.
- Determinar una o varias propiedades de la proteína NS4A que limiten o inhiban la actividad de proteasa de NS3-4A del VHC.

4. Metas

- Conocer si existen variantes naturales de NS4A que modifican la actividad de proteasa de NS3-4A del VHC-dh.
- Determinar si una variante específica de NS4A genera el mismo efecto sobre una proteasa de distinto subtipo de VHC.
- Aportar nueva información sobre las características de NS4A que permitan manipular la actividad proteolítica de NS3-4A del VHC.

5. Material y métodos

Se obtuvieron trece muestras de suero sanguíneo de donadores de sangre en el Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, México de Marzo a Septiembre de 2006. Las muestras fueron analizadas por inmunoensayo anti-VHC de tercera generación (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y descartadas para transfusión.

Se utilizó la secuencia de la proteína NS3 de dos subtipos virales VHC-1b y VHC-dh denominadas en lo sucesivo como: NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ y NS3₍₁₋₁₈₁₎ respectivamente; así mismo NS3₍₁₋₆₃₁₎ hace referencia a la secuencia completa de la proteína NS3. Estas secuencias fueron expresadas solas o unidas a variantes de NS4A.

5.1. Obtención de los genes del VHC

Las secuencias nucleotídicas del VHC se obtuvieron por ensayos de retro-transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El ARN viral se aisló de muestras de suero sanguíneo con el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) que se basa en el proceso de purificación de ácido nucleico por el método de fenol-cloroformo. El suero sanguíneo (200 µL) se mezcló en vórtex en presencia de 600 µL de Trizol dejando reposar la solución por 5 min, posteriormente se aplicó cloroformo (160 µL), se mezcló vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente 5 min, la reacción se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4 °C, el sobrenadante recuperado se mezcló con 300 µL de isopropanol. 10 minutos después se centrifugó nuevamente a 12 000 x g por 10 min a 4 °C. El botón de ácido nucleico obtenido se lavó con etanol 70% y posteriormente se resuspendió en 20 µL de agua purificada.

Las secuencias nucleotídicas del VHC (variantes de NS3, NS4A, NS3-4A y NS5AB) se amplificaron por reacciones de RT-PCR con el protocolo estándar del paquete comercial Access RT-PCR System (Promega, Madison, WI) utilizando una polimerasa de ADN de alta fidelidad *Pfu* (MBI Fermentas) e iniciadores específicos (Anexo 1).

La secuencia nucleotídica de las variantes de NS3₍₁₋₁₈₁₎ y NS4A₍₂₁₋₃₂₎ se amplificaron bajo las siguientes condiciones de RT-PCR: 50 °C por 45 min (retrotranscripción), 95 °C por 50 seg (preciclo) y 35 ciclos de desnaturalización (94 °C por 45 seg), alineamiento (57 °C por 1 min) y extensión (70 °C por 1 min).

Las variantes de la secuencia de la proteína completa NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎ se obtuvieron con: 50 °C por 45 min (retrotranscripción), 95 °C por 50 seg (preciclo) y 35 ciclos de desnaturalización (94 °C por 45 seg), alineamiento (57 °C por 1 min) y extensión (71 °C por 2 min).

Para obtener la secuencia NS5AB₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎ se usaron los siguientes parámetros: 50 °C por 45 min (retrotranscripción), 95 °C por 50 seg (preciclo) y 35 ciclos de desnaturalización (94 °C por 45 seg), alineamiento (60 °C por 1 min) y extensión (71 °C por 2 min).

5.1.1. Clonación de los genes del VHC

Para clonar la secuencia de los genes NS3, NS3-4A, NS5AB y sus variantes se siguió el siguiente procedimiento. La secuencia obtenida por RT-PCR o PCR se incubó con 1 µL del plásmido pCR 2.1-TOPO y 1 µL de solución salina (NaCl [1.2 M], MgCl₂ [0.06 M]) por 10 min a 23 °C. La secuencia obtenida se utilizó para transformar químicamente células *E. coli* TOP10 (Invitrogen) siguiendo el protocolo del proveedor. Las células transformadas se cultivaron por 12 hrs a 37 °C en medio líquido Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina [100 µg/ml]. Posteriormente se cultivaron en medio semisólido de agarosa, LB, ampicilina y X-gal [40 mg/ml] como determinante de transformación seleccionando 10 colonias bacterianas de color blanco. Cada colonia se cultivó en 3 mL de medio líquido LB, ampicilina 12 hrs a 37 °C.

Las células transformadas se lavaron con 3 ciclos de centrifugación-resuspensión en solución STET (Tris-HCl [10 mM], EDTA [1 mM], NaCl [100 mM]). La secuencia de interés se extrajo mezclando 5 min en vórtex el paquete celular resuspendido en 350 µL de STET y 25 µL de lisozima [10 mg/mL], la reacción se detuvo por ebullición durante 1 min. La solución fue entonces centrifugada a 12 000 x g 10 min y el sobrenadante recuperado se incubó 20 min a 37 °C con 1 µL de ribonucleasa T1 (MBI Fermentas). Se agregaron 75 µL de acetato de sodio [3 M] y 250 µL de isopropanol, se incubó por 10 min a 23 °C y la solución se centrifugó a 12 000 x g 10 min. La pastilla recuperada se lavó con etanol al 70% y la secuencia se verificó por restricción enzimática y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

5.1.2. Obtención de la región específica de los genes del VHC

Para la obtención de las secuencias TOPO-NS3₍₁₋₁₈₁₎, TOPO-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎, TOPO-NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Awt₍₁₋₅₄₎, TOPO-NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2₍₁₋₅₄₎ y TOPO-NS5AB₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎ el gen previamente clonado se amplificó por PCR e iniciadores específicos delimitando la región de interés con un sitio de restricción enzimática SacI en el extremo 5' y EcoRV en el extremo 3' (Anexo 1).

5.2. Análisis de secuencia de los genes del VHC

Se realizó un alineamiento entre las secuencias obtenidas y la secuencia consenso del VHC-1b (aislado HCV-BK, Simmonds y cols. 1993) con el paquete computacional Lasergene v8.0 (DNA Star, Madison, WI). Se secuenció un grupo de 10 clonas por muestra de NS4A. La secuencia de NS4A más abundante de cada grupo se determinó como la variante predominante de cada muestra.

5.3. Construcción de variantes de NS4A₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎

Para la construcción de variantes de la cadena única de aminoácidos NS4A₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ se modificó el método desarrollado por Taremi y cols. (1998) que consiste en fusionar la secuencia de NS4A con la de NS3 por PCR e iniciadores específicos. En el presente trabajo se hicieron dos modificaciones principales: i) la reacción para fusionar las secuencias de NS3 y NS4A se dividió en dos fases permitiendo construir un mayor número de variantes de NS4A al intercambiar los iniciadores para insertar la secuencia de NS4A; ii) la secuencia fue insertada en el plásmido de expresión PinPoint Xa-3 (Promega) que produce proteínas susceptibles de ser biotiniladas *in vivo* permitiendo su purificación en condiciones no desnaturalizantes.

En la primera reacción de PCR (fase 1) se utilizó la secuencia previamente clonada TOPO-NS3₍₁₋₁₈₁₎ o TOPO-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ (procedimiento 5.1.2.) como templado de la reacción y el iniciador NS4Awt₍₂₁₋₃₂₎-NS3₍₁₋₁₈₁₎ S Fase 1 para insertar la secuencia nucleotídica para los aminoácidos 26-32 de NS4A y los codones para el asa GSGS en el marco de lectura de NS3. El producto de esta reacción se utilizó como templado en la segunda fase en la cual se insertó el resto de la secuencia de NS4A (aminoácidos 21-25) y los codones para los aminoácidos IEGR con el iniciador NS4Awt₍₂₁₋₃₂₎-NS3₍₁₋₁₈₁₎ S Fase 2. Con este procedimiento se obtuvo la secuencia para cada variante de la cadena única NS4A₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ (Fig. 3). Durante estos ensayos cada secuencia fue delimitada en el extremo 5' con un sitio de restricción enzimática SacI y en el extremo 3' con la secuencia de restricción para EcoRV. Las condiciones del ensayo fueron: 95 °C por 50 seg (preciclo) y 30 ciclos de desnaturalización (94 °C por 45 seg), alineamiento (55 °C por 1 min) y extensión (70 °C por 2 min).

Se realizó el mismo procedimiento utilizando los iniciadores correspondientes en cada reacción de PCR (Anexo 1) para fusionar las variantes de NS4A con el dominio de proteasa del VHC-dh:

variantes: NS4Am2₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎
NS4Am2 30-32₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎
NS4Am2 23,25₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎

o con la proteasa del VHC-1b:

variantes: NS4Awt₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎
NS4Am2₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎
NS4Am2 24₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎

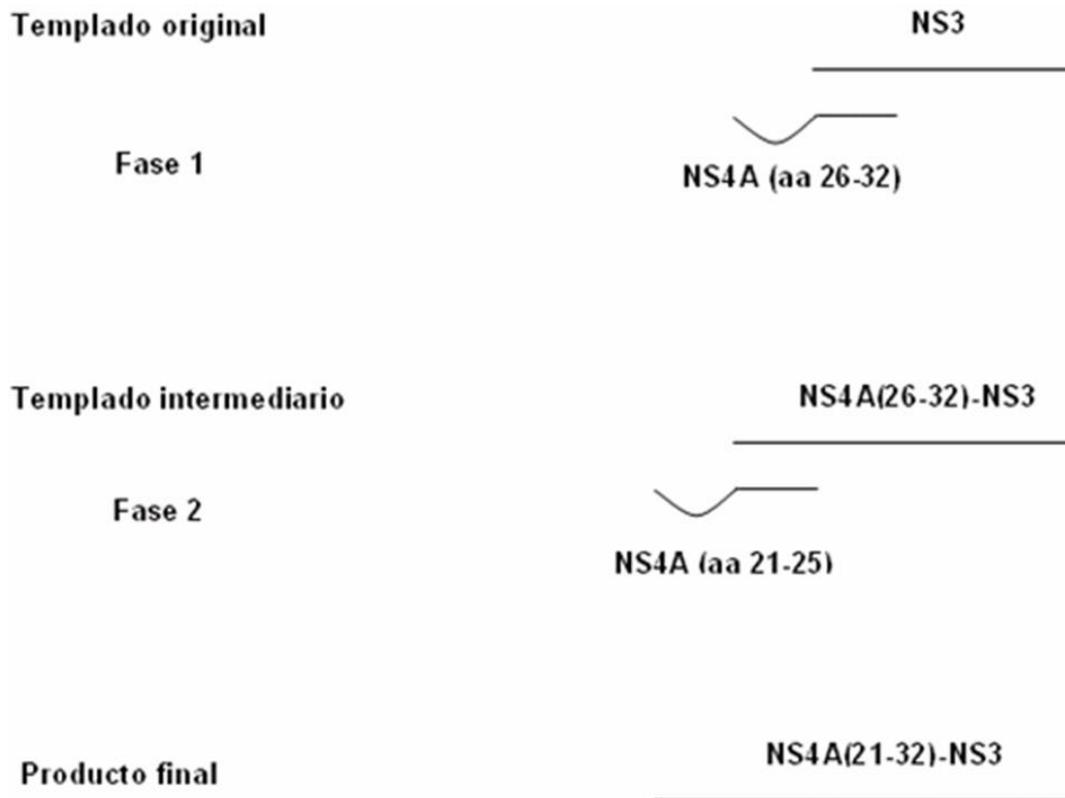


Figura 3. Estrategia de construcción de variantes de la cadena única de aminoácidos NS4A₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎. La secuencia para la proteína NS4A es fusionada con la del templado NS3 en dos ensayos de reacción de PCR e iniciadores específicos. aa, aminoácido.

5.4. Construcción de la secuencia nucleotídica para la variante NS3₍₁₋₆₃₁₎-NS4Am2 30-32₍₁₋₅₄₎

La secuencia previamente clonada TOPO-NS3₍₁₋₆₃₁₎-NS4Am2₍₁₋₅₄₎ (procedimiento 5.1.2.) se amplificó con el protocolo del paquete comercial Gene Editor in vitro Site-Directed Mutagenesis System (Promega) utilizando el iniciador NS3₍₁₋₆₃₁₎-NS4Am2 30-32₍₁₋₅₄₎ S que induce el cambio en los nucleótidos que corresponden con los aminoácidos 23 y 25 de NS4A y el iniciador de selección de clonas por antibióticos Selection Oligonucleotide Top Strand (Promega) (Anexo 1).

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 95 °C por 50 seg (preciclo) y 35 ciclos de desnaturalización (94 °C por 45 seg), alineamiento (59 °C por 1 min) y extensión (71 °C por 2 min).

El fragmento obtenido de este ensayo se clonó en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) como se describe en el procedimiento 5.1.1. Las células transformadas se cultivaron por 12 hrs a 37 °C en medio semisólido de agarosa y medio LB suplementado con 3 µL de la mezcla comercial de antibióticos Gene Editor Antibiotic Selection Mix (Promega). La presencia del fragmento clonado se determinó por restricción enzimática XmaI y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

5.5. Construcción de la secuencia de expresión para proteína NS5A_{B(2258-2622)} y las variantes de NS3

Como procedimiento estándar, las secuencias nucleotídicas para las proteínas del VHC fueron delimitadas con los sitios de restricción *SacI* y *EcoRV* en los extremos 5' y 3' respectivamente.

La clonación de estas secuencias en el plásmido de expresión PinPoint Xa-3 se realizó con el siguiente procedimiento. La secuencia nucleotídica del VHC y la del PinPoint Xa-3 se incubaron independientemente con 1 μ L de enzima de restricción *SacI* y *EcoRV* 1 hr a 37 °C, la reacción se detuvo elevando la temperatura a 65 °C por 10 min. El producto separado por electroforesis en gel de agarosa se purificó con el protocolo estándar del kit de purificación Wizard MiniPreps PCR purification system (Promega). La secuencia se unió con la del PinPoint Xa-3 incubando 1 μ L de cada secuencia con 2 μ L de ligasa T4 por 1 hr a 23 °C. La secuencia obtenida (gen VHC-PinPoint Xa-3) se utilizó para transformar químicamente células *E. coli* JM109 (Promega) siguiendo el procedimiento del proveedor. Las células transformadas se cultivaron como se describe en el procedimiento 5.1.1. La presencia de la secuencia de interés se determinó por restricción enzimática y se confirmó por secuenciación.

5.6. Expresión y purificación de proteínas

La expresión de las proteínas recombinantes del VHC se realizó en células *E. coli* JM109 transformadas con el vector de expresión PinPoint Xa-3 que posee el promotor artificial *tac* río arriba de la secuencia de interés. El cultivo celular con el vector se diluyó 1:100 en medio de expresión (medio LB, ampicilina [100 μ g/mL], biotina [2 μ M], glucosa 0.3%) y se incubó 1 hr a 37 °C, la expresión de la proteína fue inducida agregando el análogo de lactosa, IPTG [400 μ M] y cultivando por 3 hrs a 23 °C.

Posteriormente se colectaron las células por centrifugación y se resuspendieron en amortiguador de lisis (Tris-HCl [50 mM], pH 7.5, glicerol 3%, DTT [5 mM], NaCl [300 mM], Tween 20 0.1%). La solución fue centrifugada a 12,000 x *g* 30 min. y el sobrenadante se aplicó a una resina de polimetacrilato acoplada a avidina (SoftLink Resin; Promega). Se siguió el procedimiento del fabricante con los siguientes amortiguadores específicos. Inicialmente la resina se lavó 5 veces con amortiguador A (Tris-HCl [50 mM], pH 7.5, glicerol 3%, DTT [1 mM], NaCl [300 mM]). El sobrenadante celular se aplicó a la resina y se incubó 3 hrs a 4 °C, posteriormente la resina se lavó 3 veces con amortiguador A. La proteína biotinilada se recuperó aplicando amortiguador B (Tris-HCl [25 mM], pH 7.5, biotina [5 mM], glicerol 5%, DTT [5 mM], NaCl [200 mM]) y manteniendo la resina en reposo por 1 hr a 4 °C. Las fracciones recuperadas se incubaron 3 hrs a 21 °C con 0.5 μ g de Factor Xa (Promega) que reconoce el sitio IEGR insertado en las secuencias construidas del VHC. La solución se incubó nuevamente en la resina recuperando esta vez la fracción no unida a la resina.

La presencia de la proteína recombinante se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS y tinción de plata. La concentración de la proteína se determinó por el método de Bradford (BioRad, Richmond, CA).

5.7. Ensayo de actividad proteolítica

La actividad proteolítica de las variantes con el dominio de proteasa de NS3 (NS3₍₁₋₁₈₁₎) se determinó incubando [2 µM] de NS3 con [50 µM] de NS5AB en amortiguador de reacción (Tris-HCl [25 mM], pH 7.5, glicerol 5%, DTT [5 mM], NaCl [100 mM], EDTA [0.5 mM] y Tween 20 0.01%) por 1 hr a 21 °C. En los ensayos con la secuencia completa de la proteína (NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎) se utilizó [130 µM] de NS5AB. La reacción se detuvo agregando ácido fosfórico al 10% y desnaturalización por 3 min a 95 °C.

El producto de la reacción se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS y tinción de plata. La intensidad de la banda que corresponde con el producto de la reacción fue cuantificada por densitometría con el software Quantity-One (BioRad). La actividad proteolítica se calculó como porcentaje de sustrato procesado en comparación con la concentración de NS5AB usada como sustrato (Intensidad de la banda de NS5AB procesado / Intensidad de la banda de NS5AB control x 100). Todos los ensayos de actividad proteolítica fueron realizados 3 veces como mínimo.

5.8. Análisis de la colección de secuencias de la proteína NS4A del VHC

El análisis de la secuencia de aminoácidos 21-32 de las variantes de NS4A reportadas en el banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y las construidas en este trabajo se analizaron con el software Lasergene v8.0 (DNAS^tar, Madison). La comparación de las secuencias se realizó por el método de Chou & Fasman (método *Ab initio*) y el análisis de predicción estructural con el método de Garnier-Osguthorpe-Robson (método GOR-Threading) que determina la tendencia de cada residuo a interactuar con los demás residuos de la secuencia y selecciona la predicción estructural mas exacta en base al banco de datos de proteínas previamente cristalizadas (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

6. Resultados

6.1. Variantes de la proteína NS4A del VHC

Se analizó la secuencia de la proteína NS4A de 13 muestras de suero sanguíneo con VHC-1b amplificando la región 4870-5902 del genoma viral. De cada muestra se obtuvo un promedio de 8 clonas (reportadas en el banco de genes con los números de acceso: FJ770083-FJ770199). El alineamiento entre las secuencias obtenidas y la secuencia de referencia del VHC-1b (aislado HCV-BK; Simmonds y cols. 1993) mostró la presencia de tres variantes principales de NS4A. Se nombró variante NS4Awt a aquella que posee la misma secuencia en la región central que la NS4A del VHC-1b (aislado HCV-BK; Simmonds y cols. 1993), NS4Am2 a la variante que presentó 5 sustituciones en esta región (V23I, I25C, I30S, L31T, S32L) y NS4Am3 a la variante con tres sustituciones (V23I, I25C, I30V). La variante NS4Awt se identificó en once muestras virales, mientras que las variantes NS4Am2 y NS4Am3 fueron específicas de muestras individuales (Fig. 4). En base a la diferencia en la secuencia de NS4A se denominó VHC-dh al aislado de la muestra número 3 que presentó la variante NS4Am2.

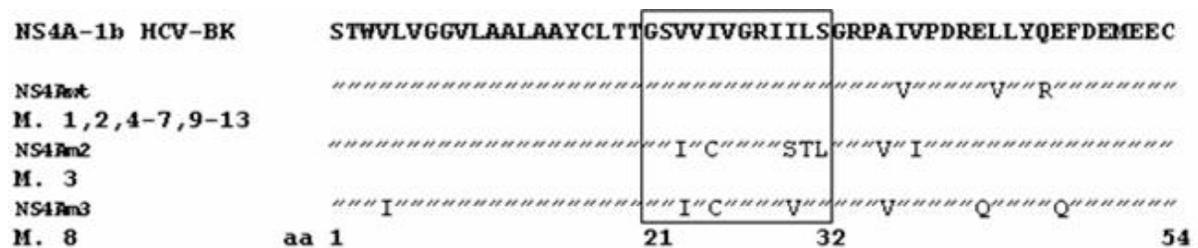


Figura 4. Predicción de la secuencia de aminoácidos de tres variantes de NS4A. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las variantes de NS4A (izquierda) con la secuencia consenso del VHC-1b (aislado HCV-BK; Simmonds y cols. 1993). La región central de NS4A (aminoácidos 21-32) se muestra enmarcada. Las comillas indican aminoácidos idénticos a la secuencia de referencia. Las secuencias de aminoácidos se muestran en código de una sola letra. M., número de muestra; aa, aminoácido.

6.2. Análisis del efecto de las variantes de NS4A sobre la actividad de proteasa de NS3-4A del VHC-dh

Se expresaron variantes de la secuencia de NS4A unidas al dominio de proteasa de NS3 (aa 1-181) del VHC-dh para analizar el efecto de los cambios en la secuencia de NS4A sobre la actividad proteolítica de NS3-4A del VHC-dh. Estos experimentos mostraron que los cambios V23I, I25C en NS4A disminuyen la actividad proteolítica de la proteína NS3-4A.

6.2.1. Expresión de la proteína NS3₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-dh

Se expresó una proteína que contiene el dominio de proteasa (aminoácidos 1-181) de NS3 a partir de la secuencia del VHC-dh. Se obtuvo por RT-PCR la secuencia para la proteína NS3₍₁₋₁₈₁₎, esta reacción produjo un fragmento de aproximadamente 550 pb que coincide con el tamaño calculado con el software de alineamiento básico BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Fig. 5A). El fragmento se insertó en el plásmido de clonación pCR 2.1-TOPO obteniéndose la secuencia TOPO-NS3₍₁₋₁₈₁₎ la cual produce 2 fragmentos de 2327 y 2140 pares de bases (pb) al ser procesada por la enzima de restricción Cail (Fig. 5B). Esta secuencia se insertó en el plásmido de expresión PinPoint Xa-3 obteniendo el vector pX-NS3₍₁₋₁₈₁₎ (Fig. 5C).

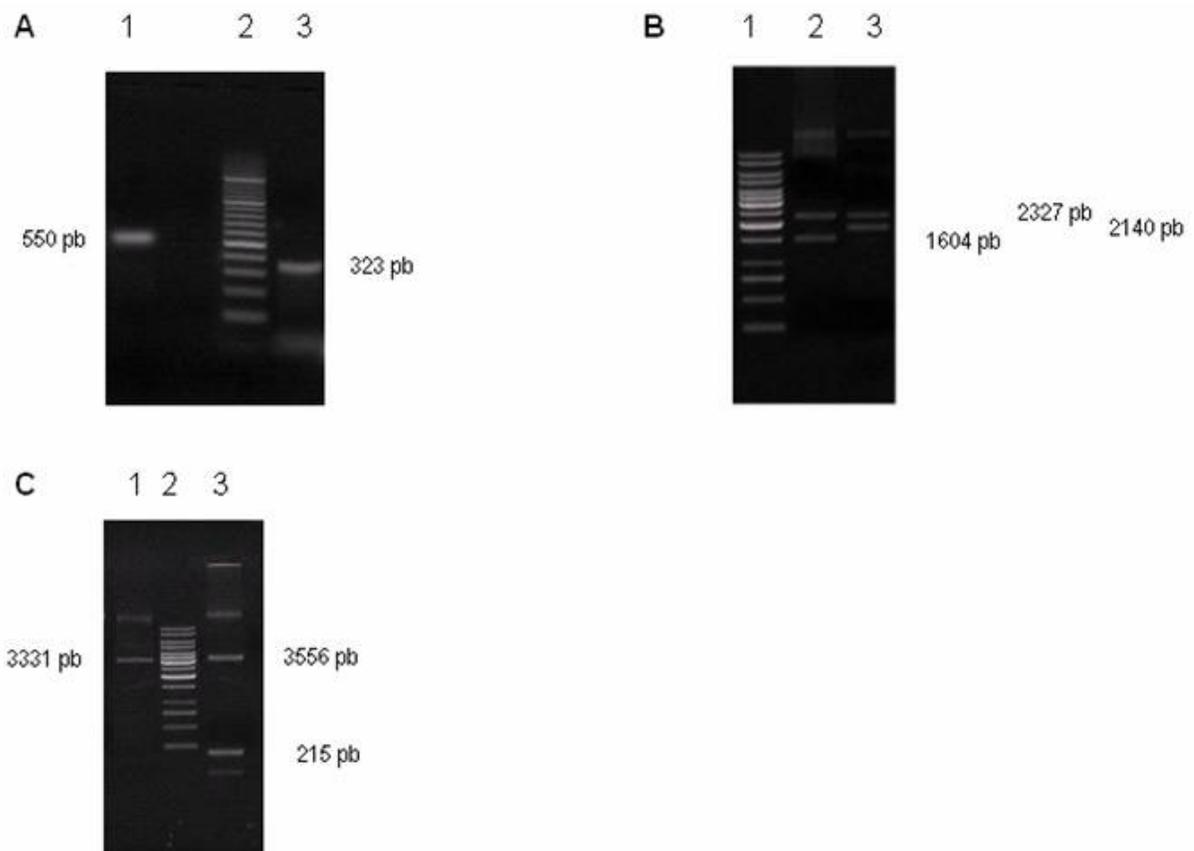


Figura 5. Obtención de la secuencia para la proteína NS3₍₁₋₁₈₁₎. **A.** Amplificación de una secuencia de 550 pb que comprende la región de la proteína NS3, carril 1; marcador de masa molecular O'RangeRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas) (Anexo 2), carril 2; control positivo de la reacción (fragmento de 323 pb (kanamicin mRNA, Promega)), carril 3. **B.** Electroforesis de la restricción enzimática del vector TOPO-NS3₍₁₋₁₈₁₎. Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (Anexo 2), carril 1; plásmido pCR 2.1-TOPO con enzima de restricción Cail, carril 2;

vector TOPO-NS3₍₁₋₁₈₁₎ con enzima de restricción Cail, carril 3. El retraso en la migración del fragmento de 1604 pb indica la presencia de la secuencia insertada (2140 pb). **C.** Restricción enzimática del vector pX-NS3₍₁₋₁₈₁₎. Plásmido PinPoint Xa-3 (plásmido vacío) con enzima XmaI, carril 1; marcador de masa molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (Anexo 2), carril 2; vector pX-NS3₍₁₋₁₈₁₎ con enzima XmaI, carril 3.

La traducción *in silico* de la secuencia obtenida pX-NS3₍₁₋₁₈₁₎ se registró en el banco de genes con el número de acceso: EU980108, esta secuencia mostró 97.8% de similitud con la secuencia de referencia del VHC-1b (aislado HCV-BK; Simmonds y cols. 1993) y contiene el marco de lectura para los aminoácidos que participan en la función de proteasa (Kim y cols. 1996; Bartenschlager 1999; Kwong y cols. 1999; De Francesco y cols. 2003) (Fig. 6).

```
1  APITAYSQQTRGLLGCIITSLTGRDKNQVEGEVQVVSTATQSFLATCVNGVC 52
53  WTVYHGAGSKTLAAPKGPITQMYTNVDQDLVGWPKPPGARSLTPCTCGSSDL 104
105  YLVTRHADVIPVRRRGDSRGSLLSPRFVSYLKGSSGGPLECPSGHAVGIFRA 156
157  AVCTRGVAKAVDFIPVESMETTMRS*
```

Figura 6. Traducción *in silico* de la secuencia para la proteína NS3₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-dh*.

Los aminoácidos que participan en la función de la proteasa se muestran subrayados. Región de unión con la proteína NS4A (residuos 1-40); Triada catalítica (H57, D81, S139); Región de unión al sustrato (R123, V132, L135, F154, R155, A157, R161, K165, D168); Sitio de captura de iones Zinc (C97, C99, C145, H149). Los aminoácidos distintos a la NS3 del VHC-1b se muestran doble tachados. *La secuencia de aminoácidos se muestran en código de una sola letra.

Esta secuencia tampoco presentó cambios de los residuos P86, P88, E176 que han sido recientemente relacionados con la capacidad de la proteasa a compensar sustituciones en la secuencia de la proteína NS4A (Com. Pers. Zuckerman, A. 2009).

A partir de la secuencia pX-NS3₍₁₋₁₈₁₎ se expresó una proteína de 20 kDa, que coincide con la masa molecular calculada para la proteasa NS3₍₁₋₁₈₁₎ (Fig. 7, carril 1).

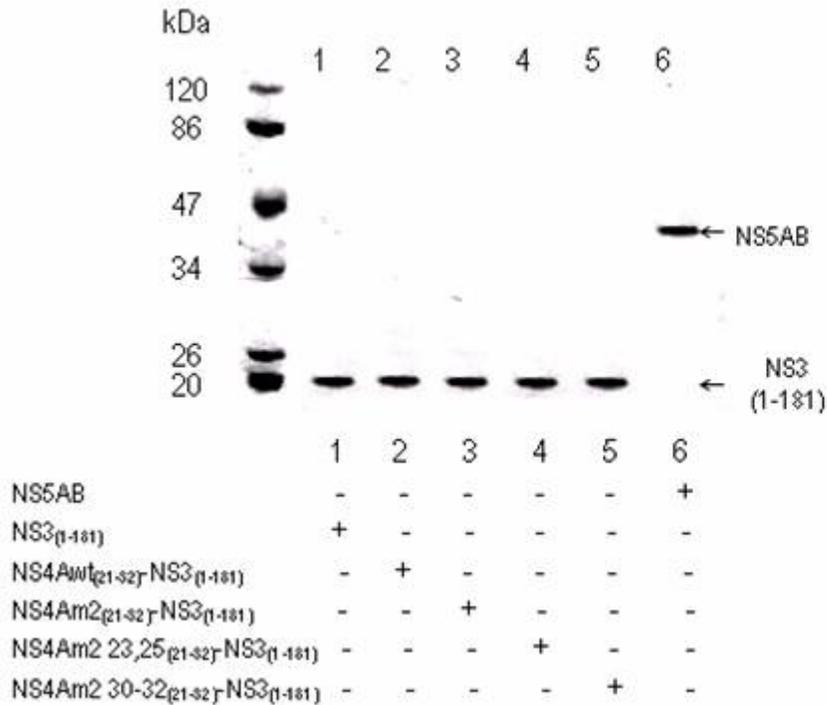


Figura 7. SDS-PAGE de las proteínas expresadas. Se muestran diferentes variantes del complejo de cadena única usando la secuencia de NS3₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-dh y la proteína NS5AB. Marcador de masa molecular (β -galactosa 120 kDa, albumina sérica bovina 86 kDa, Ovoalbumina 47 kDa, Anhidrasa carbonica 34 kDa, β -lactoglobulina 26 kDa, lisosima 20 kDa).

6.2.2. Expresión de la proteína NS5AB₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎

Se expresó la proteína NS5AB la cual contiene la secuencia del sitio de corte NS5A/NS5B de la poliproteína viral (aminoácidos 2258-2622 del aislado HCV-BK). Esta proteína se utilizó como sustrato en los experimentos con variantes de la proteína NS3-4A.

Para la obtención de la proteína NS5AB se amplificó un fragmento de 1092 pb del genoma del VHC, este fragmento fue clonado y luego utilizado para construir el vector de expresión pX-NS5AB₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎ (Fig. 8A). La transcripción *in silico* de la secuencia obtenida (acceso número: EU980112) mostró que posee la región de aminoácidos D/E-X-I/V-V/L-C-C/T_{corte}S/A-X-X-W/Y que sirve como sustrato para la NS3-4A (Bartenschlager y cols. 1995; Steinkühler y cols. 1996) (Fig. 8B). A partir de la secuencia pX-NS5AB₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎ se expresó una proteína de 40 kDa que coincide con la masa molecular calculada para la proteína NS5AB (Fig. 7, carril 6).

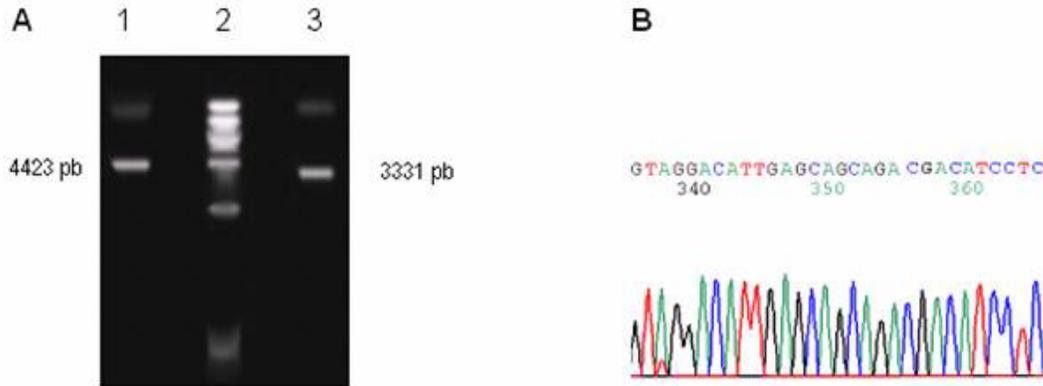


Figura 8. Obtención de la secuencia para la proteína NS5AB₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎. **A.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del vector de expresión pX-NS5AB₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎. Secuencia pX-NS5AB₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎ (secuencia del plásmido PinPoint Xa-3 con la secuencia de NS5AB₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎) con enzima de restricción XmaI, carril 1; marcador de masa molecular Lambda DNA/HindIII 2 (Fermentas) (Anexo 2), carril 2; plásmido PinPoint Xa-3 vacío con enzima de restricción XmaI, carril 3. El retraso en la migración de la marca del carril número 3 señala la presencia de la secuencia insertada en el PinPoint Xa-3. **B.** Secuencia del extremo 3' del vector de expresión pX-NS5AB₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎; la secuencia complementaria (5'- gag gat gtc gtc tgc tgc tca atg tcc tac - 3') a la cadena mostrada genera el marco de lectura para los aminoácidos E-D-V-V-C-C_{corde}S-M-S-Y de la región de corte NS5A/NS5B en la poliproteína viral (Steinküler y cols. 1996).

6.2.3. Expresión de variantes del complejo NS4A₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-dh

Se construyeron las secuencias nucleotídicas para expresar la proteasa NS3₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-dh unida a las variantes NS4Awt y NS4Am2. Con la estrategia adaptada en este proyecto para construir variantes de la cadena única de aminoácidos, se amplificó por PCR la secuencia de NS3 (TOPO-NS3₍₁₋₁₈₁₎) con iniciadores específicos para unir la secuencia de la variante de NS4A. Esta secuencia se clonó en el plásmido pCR2.1-TOPO y posteriormente se insertó en el vector de expresión PinPoint Xa-3 (pX-NS4Awt₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎) (Fig. 9A) la cual contiene la secuencia NS4Awt del VHC-1b unida por el asa GSGS al extremo N-terminal de la proteasa NS3₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-dh (Cuadro 3; Fig. 9B). Con esta secuencia se expresó una proteína de 20 kDa que corresponde con la masa molecular del complejo NS4Awt₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ (Fig. 7, carril 2).

Se amplificó la secuencia de NS3 (TOPO-NS3₍₁₋₁₈₁₎) en otro grupo de ensayos de PCR, esta vez para unir a NS3 la secuencia de NS4Am2. Se construyó el vector de expresión pX-NS4Am2₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ (Fig. 10) con el cual se expresó la proteína NS4Am2₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ formada por la secuencia de NS4Am2 y la proteasa NS3, ambas provenientes del VHC-dh (Fig. 7; Cuadro 3).

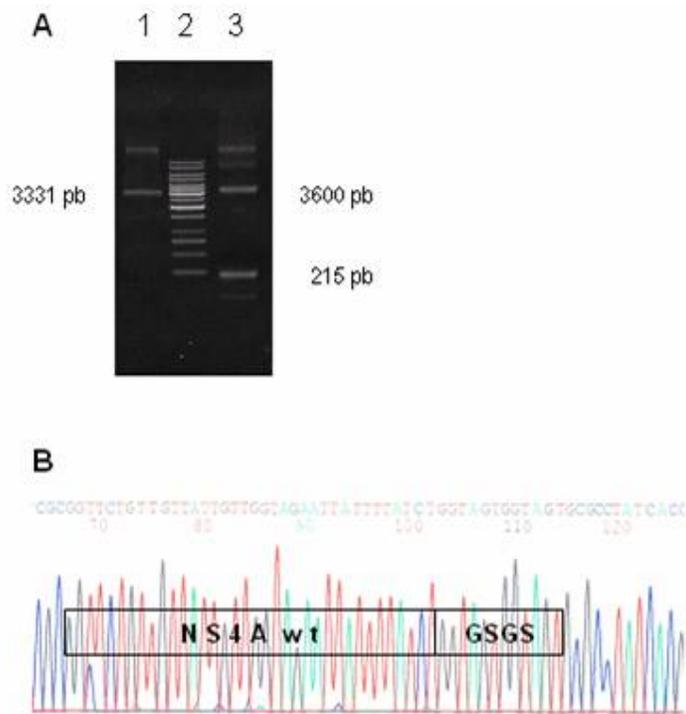


Figura 9. Secuencia NS4Awt₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎. **A.** Verificación del vector de expresión pX-NS4Awt₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ por restricción enzimática. Plásmido PinPoint Xa-3 (plásmido vacío) con enzima de restricción XmaI, carril 1; marcador de masa molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) (Anexo 2), carril 2; plásmido de expresión pX-NS4Awt₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎, con enzima XmaI, carril 3. **B.** La secuencia nucleotídica de NS4Awt (bases 67-102) se unió por medio de la secuencia para el asa GSGS (bases 103-114) al extremo N-terminal de la proteína NS3.

Cuadro 3. Grupo de proteínas expresadas con la proteasa NS3 del VHC-dh y variantes de NS4A.

Variante	Secuencia de NS4A *	Origen de NS3
NS4Awt (21-32)-GSGS-NS3(1-181)	21-GSVVIVGRIILS-32	VHC-dh
NS4Am2 (21-32)-GSGS-NS3(1-181)	21-"I"C""""STL-32	VHC-dh
NS4Am2 23,25 (21-32)-GSGS-NS3(1-181)	21-"I"C""""""-32	VHC-dh
NS4Am2 30-32 (21-32)-GSGS-NS3(1-181)	21-" "" "" "" "" "" "" "" STL-32	VHC-dh

* La secuencia de aminoácidos de la región 21-32 de NS4A se muestran en código de una sola letra. Las comillas indican residuos iguales a la secuencia consenso.

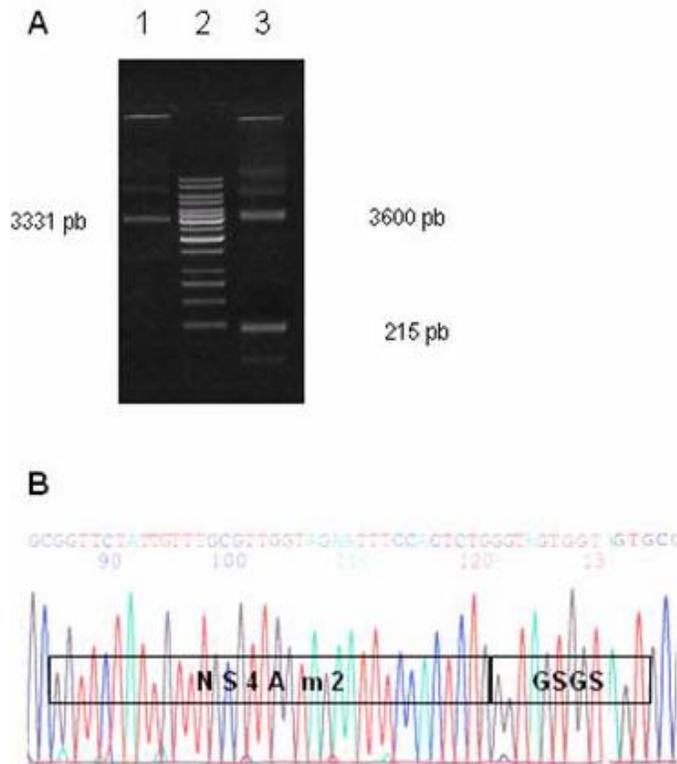


Figura 10. Obtención de la variante NS4Am₂₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎. **A.** Verificación del fragmento insertado en el vector de expresión pX-NS4Am₂₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ por restricción enzimática. Secuencia PinPoint Xa-3 (plásmido vacío) con enzima de restricción Xmal, carril 1; marcador de masa molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) (Anexo 2), carril 2; vector pX-NS4Am₂₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ con enzima Xmal, carril 3. **B.** Verificación de la secuencia obtenida por análisis de secuenciación. Se muestra la variante NS4Am2 (bases 86-121) fusionada al extremo 5' de la secuencia de NS3 a través del asa de unión GSGS (bases 122-133).

6.2.4. Actividad proteolítica de variantes del complejo NS4A₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-dh

Se determinó que la secuencia de NS4Am2 produce baja actividad proteolítica en la proteína NS3-4A del VHC-dh. La proteína formada por la variante NS4Am2 y NS3, ambas provenientes del mismo aislado viral (VHC-dh), procesó 51% del sustrato (proteína NS5AB). Esta actividad es tan baja como la de NS3 cuando es expresada sin ninguna variante de NS4A (Fig. 11, carriles 6 y 8). Ya que previamente ha sido reportado que NS4A incrementa la actividad de NS3, se analizó si la actividad proteolítica de NS3 del VHC-dh podía ser incrementada.

Cuando la secuencia NS3 del VHC-dh se expresó unida a la variante NS4Awt que posee la secuencia consenso de la región central (aa 21-32) de NS4A (aislado HCV-BK; Simmonds y cols. 1993), su actividad proteolítica aumentó a 89% (Fig. 11, carril 7). En este ensayo se comprobó que

la actividad proteolítica del VHC-dh puede ser incrementada por NS4A como previamente se ha reportado (Shimizu y cols. 1996; Sardana y cols. 1999; Lindenbach & Rice 2005) y sugiere que los cambios en la secuencia de NS4Am2 están relacionados con la baja actividad proteolítica observada con la proteína NS4Am2₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎. Con estos ensayos se comprobó también que el modelo de la cadena única de aminoácidos NS4A₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ permite determinar el efecto de NS4A sobre la actividad proteolítica de NS3-4A.

6.2.5. Comparación de las características estructurales de la región 21-32 de las variantes NS4Awt y NS4Am2

La secuencia de NS4Am2 mostró diferencias en la estructura secundaria que forma. Los análisis de cristalografía reportados previamente del complejo NS3-4A muestran que los aminoácidos de la región central de NS4A (residuos 21-32) generan una cadena beta que complementa la estructura tipo beta-barril de NS3 e incrementa su actividad proteolítica (Kim y cols. 1996; Yan y cols. 1998).

La comparación de la secuencia de aminoácidos 21-32 entre las variantes NS4Awt y NS4Am2 por el método de Chou & Fasman mostró que NS4Am2 posee en su extremo C-terminal, una región flexible que modifica la rigidez de la cadena beta con la que se une a NS3 (Fig. 12, esquemas A y B) y se estableció que los cambios I30S, L31T, S32L en la secuencia de NS4Am2 provocan la modificación de la estructura (Fig. 12, esquema C).

Se construyeron dos secuencias derivadas de NS4Am2. La variante NS4Am2 30-32 con los cambios I30S, L31T, S32L que generan la modificación de la cadena beta (Fig. 12, esquema C) y la variante NS4Am2 23,25 que contiene los cambios V23I e I25C, que son comunes en las variantes determinadas NS4Am2 y NS4Am3 (Fig. 4; Fig. 12).

6.2.5.1. Expresión de variantes derivadas de NS4Am2

Se construyeron las variantes derivadas de NS4A (NS4Am2 23,25 y NS4Am2 30-32) (Cuadro 3) uniendo por PCR la secuencia para NS4Am2 30-32 o NS4Am2 23,25 al extremo 5' de la NS3 del VHC-dh. La subclonación de estas secuencias permitió obtener los vectores de expresión pX-NS4A 23,25₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ y pX-NS4A 30-32₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ los cuales presentan unida al extremo N-terminal de NS3 la secuencia de la variante NS4Am2 30-32 (Fig. 13), o la de NS4Am2 23,25 (Fig. 14).

Las proteínas obtenidas corresponden a los carriles 4 y 5 de la figura 7.

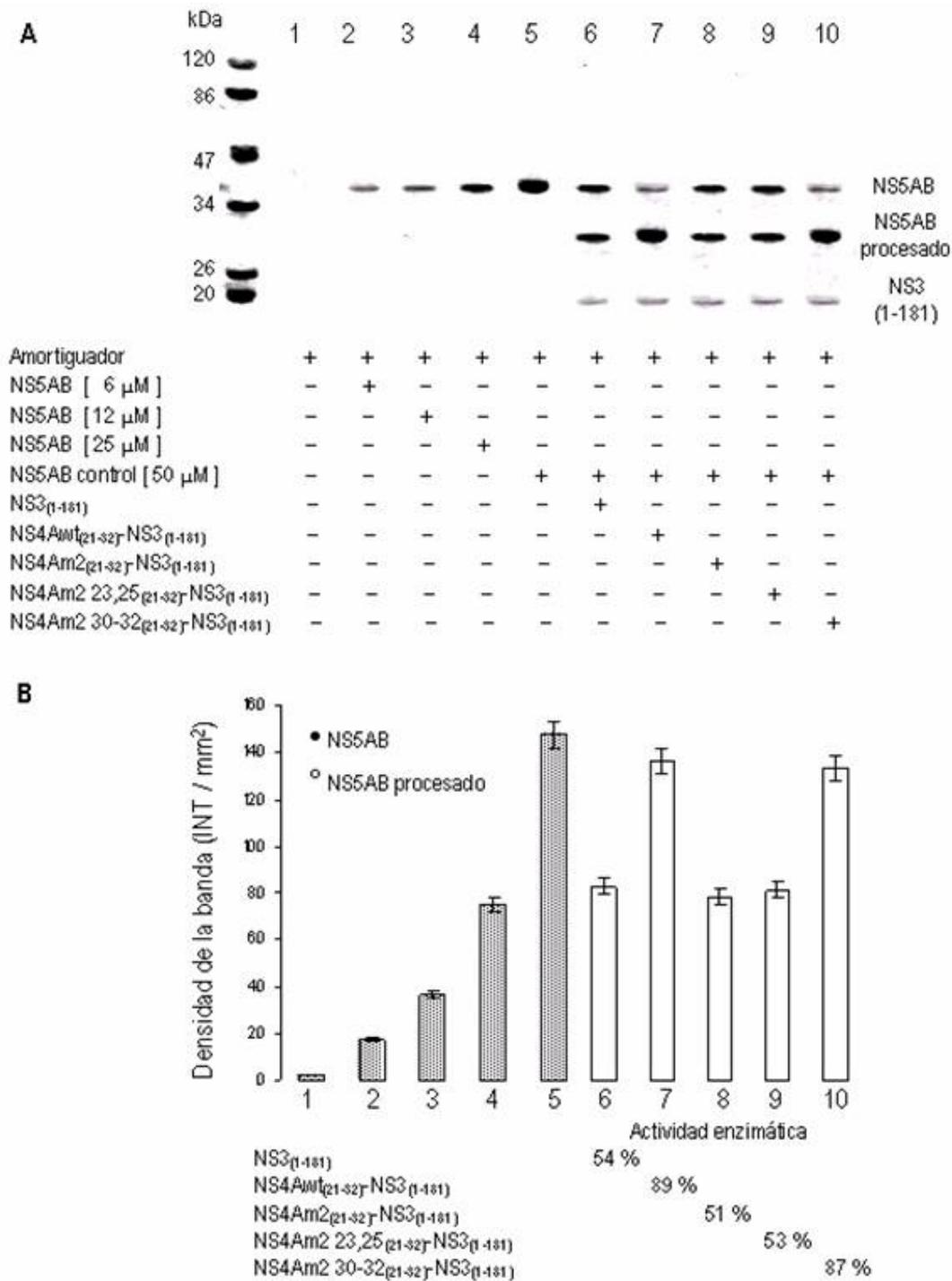


Figura 11. Actividad enzimática de variantes de la cadena única usando la secuencia NS3₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-dh. **A.** Electroforesis en gel SDS-PAGE al 12% de los productos de la reacción. Se muestran diferentes combinaciones de la proteína NS3₍₁₋₁₈₁₎ unida a variantes de NS4A. **B.** Cuantificación de la actividad enzimática (Densidad de la banda de NS5AB procesado / Densidad de la banda de NS5AB control x 100). Cada valor representa al menos tres experimentos como el mostrado en 11A.

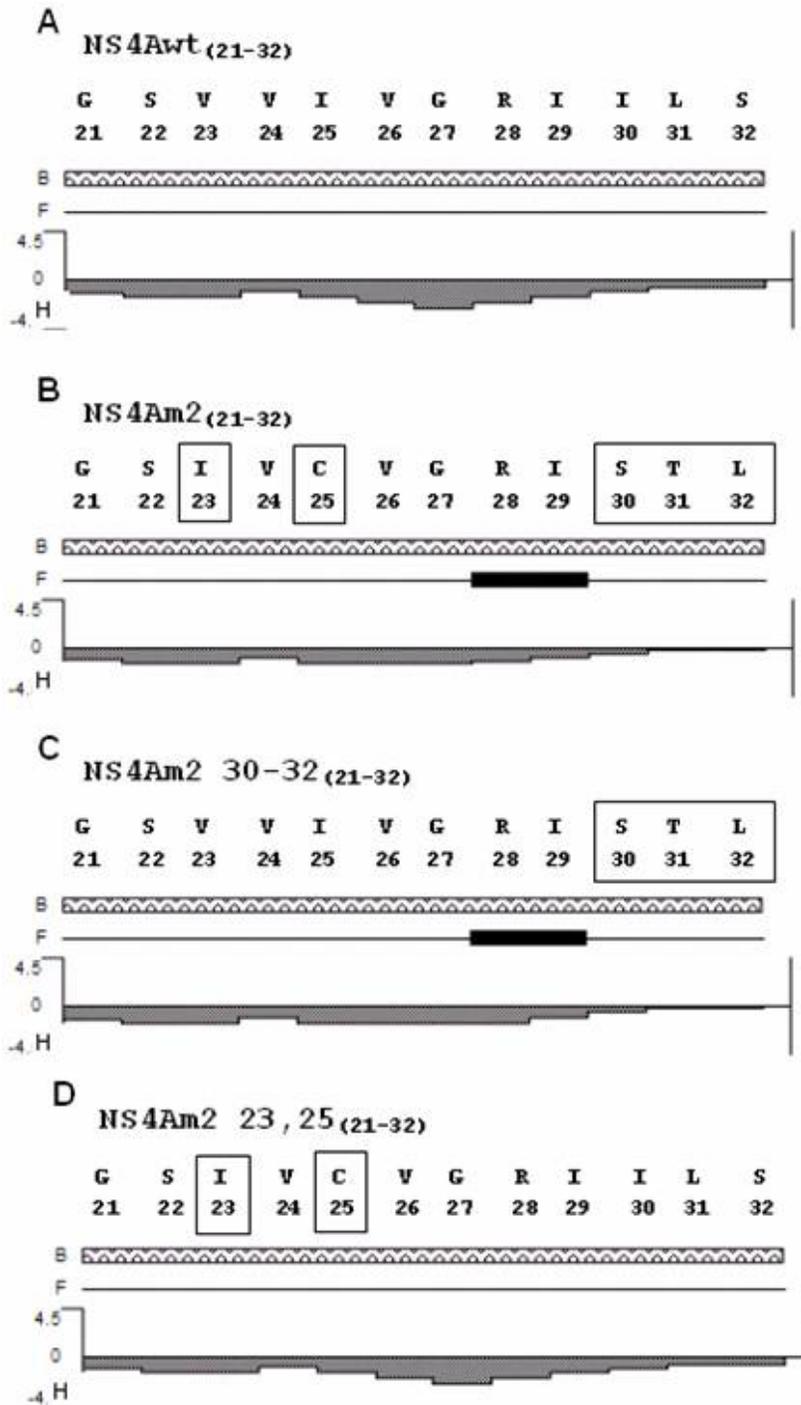


Figura 12. Esquema de las características calculadas por el método de Chou & Fasman de variantes de NS4A. Residuos 21-32 de NS4Awt, NS4Am2 y dos secuencias construidas a partir de NS4Am2 como se indica. Los residuos diferentes a cada variante se muestran enmarcados. B, estructura beta plegada; F, región flexible; H, índice de hidrófobo.

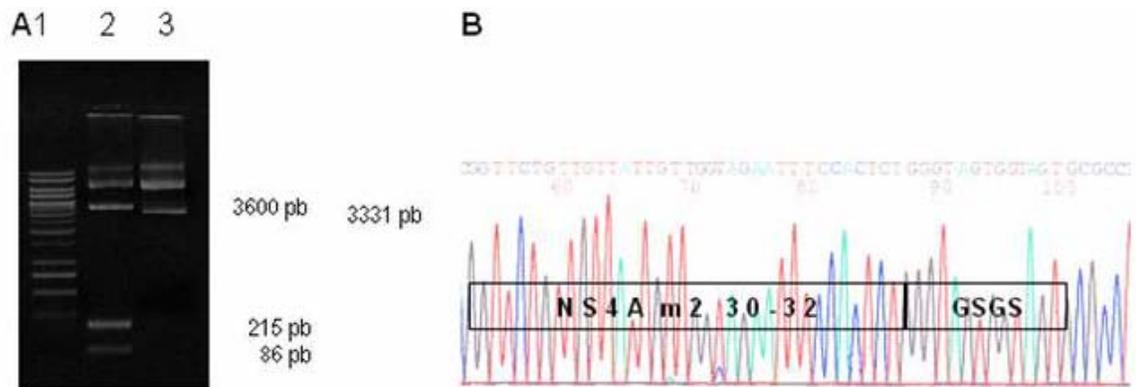


Figura 13. Construcción de la variante NS4Am2 30-32₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎. **A.** Verificación de la secuencia por restricción enzimática. Marcador de masa molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) (Anexo 2), carril 1; vector pX-NS4Am2 30-32₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ con enzima de restricción XmaI, carril 2; secuencia PinPoint Xa-3 (plásmido vacío) con enzima de restricción XmaI, carril 3. **B.** Secuencia de NS4Am2 30-32 (bases 53-88) unida a la secuencia de NS3 por el asa de unión GSGS (bases 89-100).

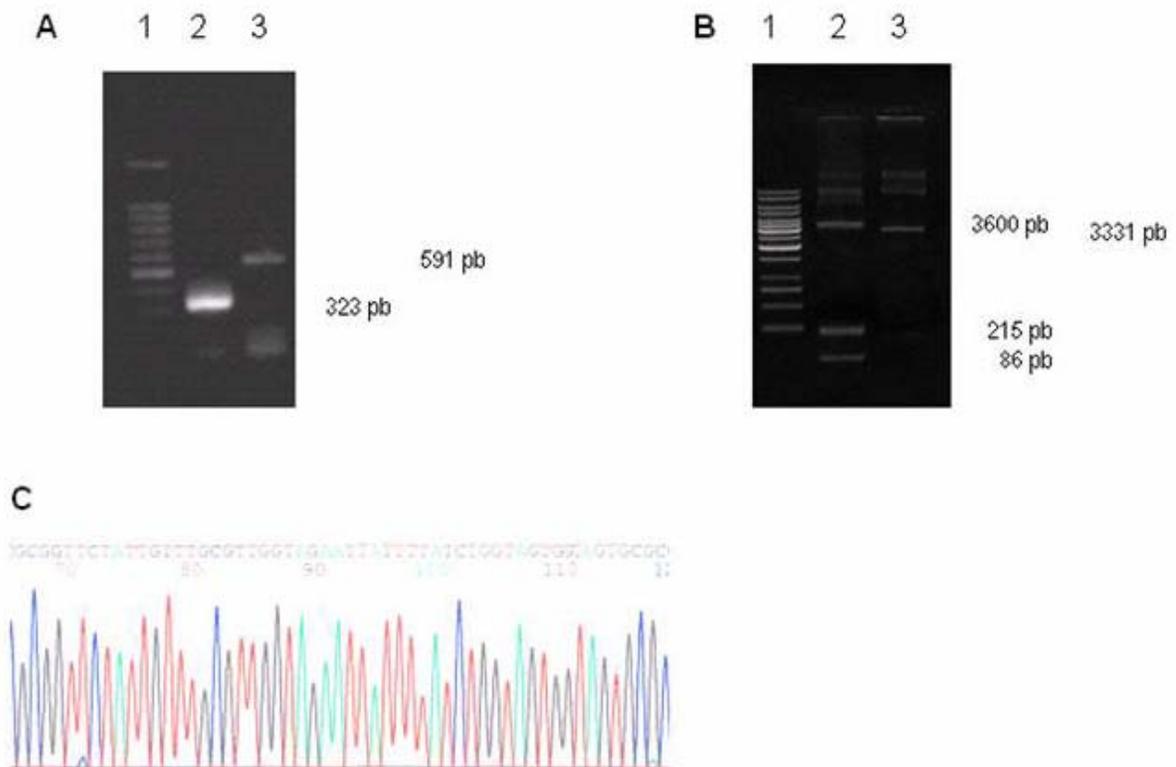


Figura 14. Obtención de la variante NS4A 23,25₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎. **A.** Secuencia construida por PCR para generar el fragmento NS4Am2 23,25-GSGS-NS3. Marcador de masa molecular

GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) (Anexo 2), carril 1; control positivo del PCR (fragmento de 323 pb (kanamycin mRNA, Promega)), carril 2; fragmento construido para la secuencia de aminoácidos NS4Am2 23,25-GSGS-NS3, carril 3. **B.** Restricción enzimática del vector pX-NS4Am2 23,25-GSGS-NS3. Marcador de masa molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (Anexo 2), carril 1; vector pX-NS4Am2 23,25-GSGS-NS3 con enzima de restricción XmaI, carril 2; secuencia PinPoint Xa-3 (plásmido vacío) con enzima de restricción XmaI, carril 3. **C.** Secuencia de la variante NS4A 23,25 (bases 68-103) unida a la secuencia de NS3 por la secuencia para el asa GSGS (bases 104-115).

6.2.5.2. Actividad proteolítica de las variantes derivadas de NS4Am2

La variante NS4Am2 30-32 con el cambio calculado en su cadena beta no limitó la actividad proteolítica de NS3-4A. La proteína NS4Am2 30-32₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ que posee la secuencia de NS4Am2 30-32, procesó 87% de sustrato. Esta actividad es tan alta como la del complejo con la secuencia silvestre NS4Awt (Fig. 11). Por el contrario, la proteína NS4Am2 23-25₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ expresada con la variante NS4Am2 23,25, solo procesó 53% de sustrato (Fig. 11, carril 9). Estos resultados sugieren que las sustituciones V23I y I25C en la secuencia NS4A están relacionados con la baja actividad proteolítica observada. Las sustituciones V23I y I25C en NS4A son comunes en las proteínas NS4Am2₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ y NS4Am2 23-25₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ que presentan actividad proteolítica limitada.

Hasta este punto se analizaron variantes de NS4A unidas a la secuencia de NS3 del VHC-dh lo cual mostró que la variante natural NS4Am2 limita la actividad proteolítica de la proteína que la contiene. El siguiente objetivo fue determinar si esta variante generaba el mismo efecto en sobre la proteasa proveniente del VHC-1b debido al reto terapéutico que este subtipo viral representa (Pawlotsky 2003, 2004; Poo y cols. 2008).

6.3. Análisis del efecto de la variante NS4Am2 sobre la actividad proteolítica de la NS3-4A del VHC-1b

Se determinó que el efecto de NS4Am2 es similar sobre la actividad de la NS3 del VHC-1b al construir proteínas recombinantes formadas por variantes de NS4A y la secuencia NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎.

6.3.1. Variantes de la proteína NS3 del VHC

Inicialmente se comparó la secuencia de la proteína NS3 de la secuencia consenso del VHC-1b (aislado HCV-BK; Simmonds y cols. 1993) con la obtenida de la muestra número 4 (Fig. 4) y se determinó 4% de diferencia entre ambas (Cuadro 4). Debido a que la variabilidad entre subtipos virales es de 25% (De Francesco y cols. 2003) se consideró a la secuencia de la muestra número 4 como subtipo VHC-1b por lo que se nombró NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎.

Cuadro 4. Análisis ClustalW entre las secuencias de NS3 obtenidas.

ClustalW	Similitud			Origen de NS3
	1	2	3	
1	—	97.2%	97.8%	VHC-dh
2	2.8%	—	96.1%	muestra 4
3	2.2%	4.0%	—	HCV-BK
	1	2	3	

Divergencia

Las variantes obtenidas de la secuencia de NS3, referidas a la derecha, fueron comparadas con la secuencia consenso del VHC-1b (aislado HCV-BK; Simmonds y cols. 1993).

Con el fin de determinar si existen diferencias en NS3 que puedan estar relacionadas con la baja actividad proteolítica observada previamente, se comparó la secuencia de la proteína NS3₍₁₋₁₈₁₎ obtenida del aislado viral VHC-dh y la propia de la muestra número 4 (NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎). El alineamiento entre la secuencia de estas proteínas mostró 97.2% de similitud entre ambas (Cuadro 4). La traducción *in silico* del marco de lectura de cada secuencia y su comparación con la secuencia consenso del VHC-1b (aislado HCV-BK; Simmonds y cols. 1993) mostró que la proteína NS3₍₁₋₁₈₁₎ posee tres cambios en los aminoácidos 122, 144, 147 (Fig. 6) y NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ presenta seis cambios en su secuencia (aminoácidos 66, 71, 87, 144, 147, 170) (Fig. 15). Estas diferencias no representan modificaciones en los residuos 1-40 con los que NS3 se une a NS4A o al sustrato (Kim y cols. 1996; Bartenschlager y cols. 1999; Kwong y cols. 1999; De Francesco y cols. 2003) (Fig. 6, Fig. 15). La gran similitud determinada entre las secuencias de NS3 coincide con el alto grado de conservación reportado para este gen (Chayama y cols. 1997; Vallet y cols. 2005; Guillou-Guillemette y cols. 2007).

```

1  APITAYSQQTRGLLGCIITSLTGRDKNQVEGEVQVISTATQSFLATCVNGVC 52
53  WTVYHGAGSKTLAGPKGPWTQMYTNVDQDLVGWPAPPGARSLTPCTCGSSDL 104
105 YLVTRHADVIPVRRRGDSRGSLLSPRFVSYLKGSSGGPLICPSGHAVGIFRA 156
157 AVCTRGVAKAVDFEFVESMETTMRS*

```

Figura 15. Secuencia de la proteína NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎. Los aminoácidos que participan en la función de la proteasa se muestran subrayados. Región de unión con la proteína NS4A (residuos 1-40); Triada catalítica (H57, D81, S139); Región de unión al sustrato (R123, V132, L135, F154, R155, A157, R161, K165, D168); Sitio de captura de iones Zinc (C97, C99, C145, H149). Los residuos diferentes a la NS3 del VHC-1b se muestran con doble tachado. *La secuencia de aminoácidos se muestra en código de una sola letra.

6.3.2. Expresión de la proteína NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎

Se amplificó la secuencia que corresponde con el dominio de proteasa de NS3 del VHC-1b, se clonó y posteriormente se insertó en el vector de expresión pX-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ (Fig. 16A), la expresión de esta secuencia generó una proteína de aproximadamente 20 kDa que coincide con la masa molecular de la proteína NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ (Fig. 16B).

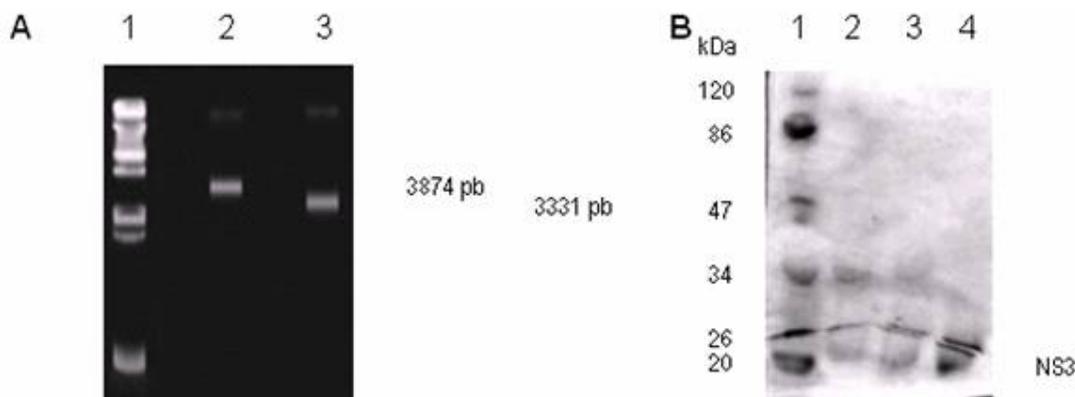


Figura 16. Obtención de la proteína NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎. **A.** Análisis del vector de expresión pX-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎. Marcador de masa molecular Lambda DNA/HindIII 2 (Fermentas) (Anexo 2), carril 1; vector pX-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ (secuencia de PinPoint Xa-3 + 543 pb de NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎) con enzima de restricción Bsu15I, carril 2; secuencia PinPoint Xa-3 (plásmido vacío) con enzima de restricción Bsu15I, carril 3. **B.** SDS-PAGE al 12% de la proteína purificada NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎. El marcador de masa molecular (se describe en la figura 7), carril 1; se muestran diferentes concentraciones de la proteína NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎, carriles 2-4.

6.3.3. Obtención de variantes del complejo NS4A₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-1b

Se construyeron dos variantes de la cadena única de aminoácidos usando las secuencias de NS4A previamente analizadas y la secuencia de NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎. Se unió por PCR e iniciadores específicos la secuencia de la variante NS4Awt y la de NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ obteniéndose un producto de 591 pb (Fig. 17A). Esta secuencia se utilizó para construir el vector de expresión pX-NS4Awt₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ el cual contiene la secuencia de NS4Awt unida al extremo N-terminal de NS3 (Fig. 17B).

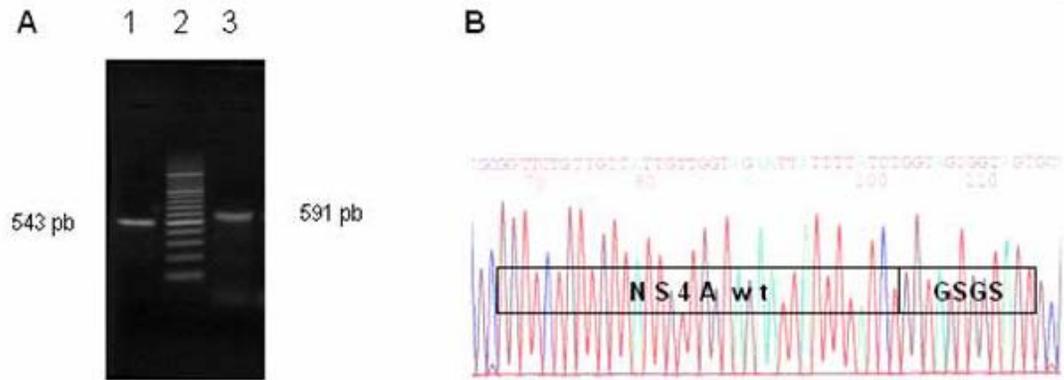


Figura 17. Secuencia obtenida para la variante NS4Awt₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎. **A.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR para unir la secuencia de la variante NS4Awt con la de NS3 del VHC-1b. Fragmento de NS3 pre-amplificado (NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎) de 543 pb, carril 1; marcador de masa molecular O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) (Anexo 2), carril 2; fragmento construido para la secuencia NS4Awt₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎, carril 3. **B.** Secuencia de la variante NS4Awt (bases 67-102) unida al extremo N-terminal de NS3 a través del asa de aminoácidos GSGS (bases 103-114).

De la misma forma se unió la secuencia nucleotídica para la variante NS4Am2 con la de NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎. La secuencia construida pX-NS4Am2₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎, contiene la variante NS4Am2 del VHC-dh unida a la NS3 del VHC-1b (Fig. 18).

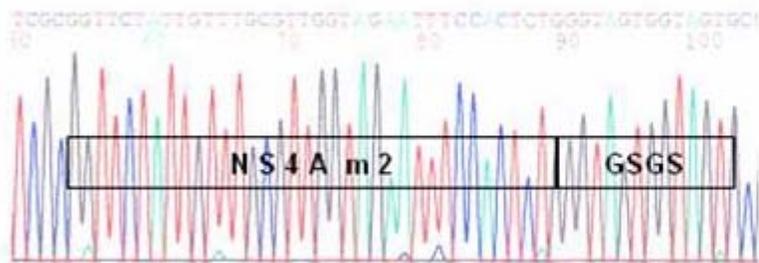


Figura 18. Obtención de la secuencia para NS4Am2₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎. Secuencia nucleotídica obtenida para la variante NS4Am2₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎. La secuencia de NS4Am2 (bases 54-89) se unió al extremo 5' de la proteína NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ por el asa de aminoácidos GSGS (bases 90-101).

6.3.4. Actividad proteolítica de variantes del complejo NS4A₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-1b

Se determinó que la variante NS4Am2 del VHC-dh limita la actividad proteolítica de NS3 del VHC-1b al igual que cuando fue expresada con la NS3 del VHC-dh (sección 6.2.4.). La proteína formada por la NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ y la variante NS4Am2 procesó 52% (\pm 2.7 %) de sustrato (Fig. 19B, carril 4). Cuando NS3 se expresó con la variante NS4Awt su actividad fue de 85% (Fig. 19B, carril 3). Estos experimentos muestran que el origen de las secuencias utilizadas de NS3 es indistinto ya que NS4Am2 afecta de igual forma la actividad proteolítica de NS3 del VHC-1b o del VHC-dh, y apoyan la observación previa sobre la relación de la secuencia de NS4Am2 y la actividad proteolítica limitada.

6.4. Obtención de variantes de la proteína completa NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎ del VHC-dh

Existen mutaciones en las proteínas del VHC que son contrarrestadas por cambios en otra región de la misma (Wakita y cols. 2005; Dahl y cols. 2007; Com. pers. Zuckerman, A. 2009). Recientemente se reportó que el dominio de helicasa de la proteína NS3 afecta la actividad de su dominio de proteasa (Beran & Pyle 2008). Por lo cual se analizó el efecto de las variantes de NS4A sobre la actividad proteolítica de la proteína completa NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎.

Las variantes expresadas de NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎ contienen los dos dominios que forman la proteína NS3 (dominio de proteasa y dominio de helicasa, residuos 1-631) así como la secuencia completa de NS4A (residuos 1-54). En base al efecto observado de NS4A en las proteínas de cadena única, se expresaron tres variantes de la proteína completa: i) la variante NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2₍₁₋₅₄₎ con la secuencia NS4Am2 que limita la actividad proteolítica; ii) la variante NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Awt₍₁₋₅₄₎ con NS4Awt que no afecta la función de la proteína y iii) la variante NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2 30-32₍₁₋₅₄₎ con los cambios 30-32 que modifican la estructura secundaria de NS4A pero no afectan la actividad proteolítica.

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 2055 pb (Fig. 20A) de la muestra de suero número 4 que posee la variante NS4Awt (Fig. 4) y una secuencia de NS3 perteneciente al subtipo VHC-1b (sección 6.3.1.). El fragmento amplificado abarca los genes NS3 y NS4A y se insertó en el vector de expresión PinPoint Xa-3 obteniéndose la secuencia pX-NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Awt₍₁₋₅₄₎ (número de acceso: FJ895110) (Fig. 20). La proteína expresada presentó la masa molecular esperada de 70 kDa (Fig. 21, carril 1).

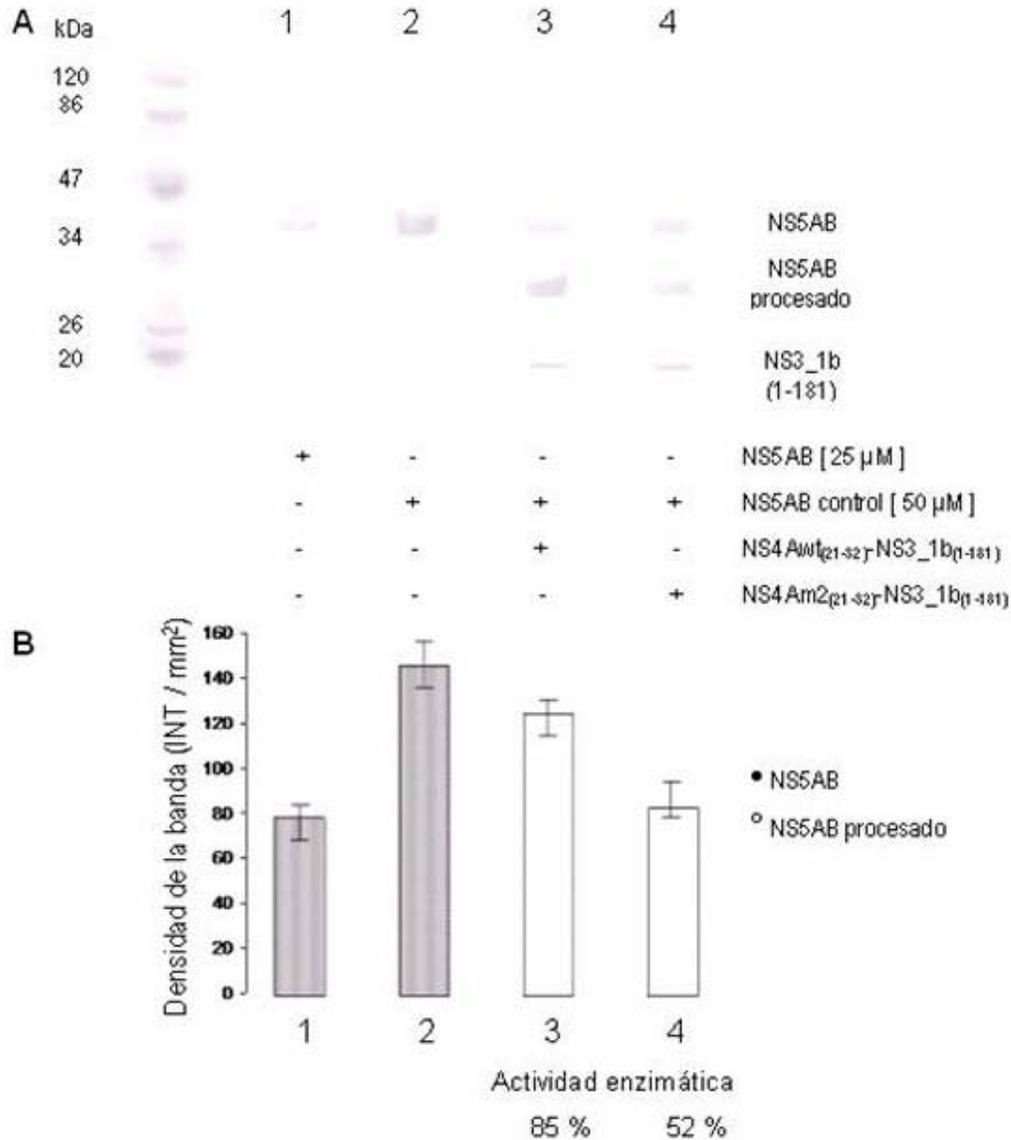
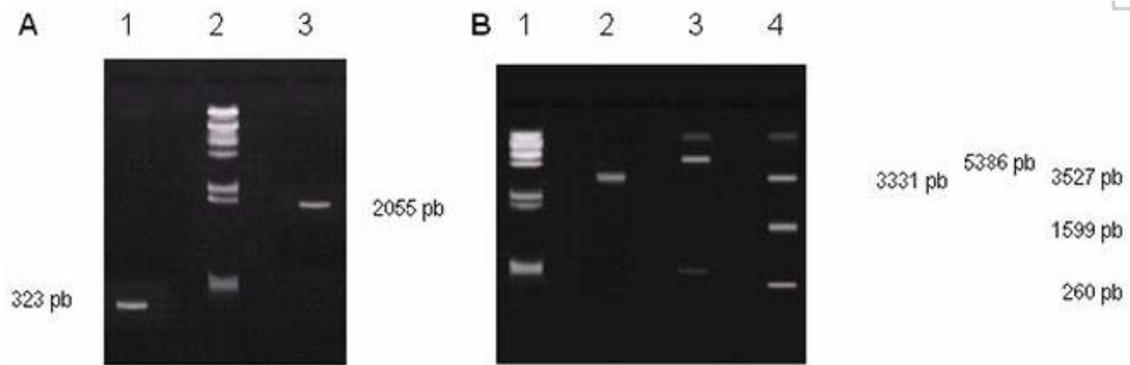


Figura 19. Actividad enzimática de variantes de cadena única usando la secuencia NS3₍₁₋₁₈₁₎ del VHC-1b. **A.** SDS-PAGE al 12% de los productos de la reacción de variantes de NS3-4A usando la secuencia de NS3 del VHC-1b como se indica a la derecha. **B.** Cuantificación de la actividad enzimática (Densidad de la banda de NS5AB procesado / Densidad de la banda de NS5AB control x 100). Cada valor representa al menos tres experimentos como el mostrado en 19A.

Cuadro 5. Secuencia de las variantes de NS4A fusionadas a la proteína NS3 del VHC-1b.

Variante	Secuencia de NS4A	Origen de NS3
NS4Aw _t (₂₁₋₃₂)-GSGS-NS3_1b(₁₋₁₈₁)	21-GSVVIVGRIILS-32	VHC-1b
NS4Am2(₂₁₋₃₂)-GSGS-NS3_1b(₁₋₁₈₁)	21-" "I"C" " " "STL-32	VHC-1b

Las comillas indican residuos iguales a la secuencia consenso del VHC-1b.



C

Secuencia de la proteína NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Awt₍₁₋₅₄₎

Domino de proteasa de NS3₍₁₋₁₈₁₎

APITAYSQQTRGLLGCIIITSLTGRDKNQVEGEVQVISTATQSFLATCVNGVCWTVYHGAGSKTLAGPKGPWTQMY
 TNVDQDLVGNPAPPGARSLTPCTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRGDSRGSLLSPRPVSYLKSSGGPLCPGHA
 VGIFRAAVCTRGVAKAVDFPVESMETTMRS

Domino de helicasa de NS3₍₁₈₂₋₆₃₁₎

PVFTDNSSPPAVPQSFQVAHLHAPTGSKGSTKVPAAAYAAQGYKVLVNLNPSVAATLSFGSYMSTAHGTEPNIRTGV
 RTTTTGSAVTYSTYGKFLADGGCSGGAYDIIICDECHSTDPTTILGIGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGSVTV
 SHPNIEEVALSSTGEVPFYGKAIPLEVIRGGRHLIFCHSKKKCDELAAKLTALGLNAVAFYRGLDVSVIPTIGDV
 VVVATDALMTGYTGDFDSDVIDCNTCVTQTVDFSLDPTFTVETTTMPQDAVSRSQRRGRTGRGKVGIIYRFVSPGER
 PSGMFDSSVLCECYDAGCAWYELTPAETTVRLRAYLNTPGLPVCQDHLEFWEGVFTGLTHIDAHFLSQTKQGGDN
 FPYLVAYQATVCARAQAPPSWDQMWKCLIRLKPTLHGPTPLLYRLGAVQNEITTTTHPVTKYIMTCMSADLEVVT

Proteína NS4A₍₁₋₅₄₎

STWVLVGGVLAALAAAYCLTTGSVVIVGRIILSGRPAWVPDREWLYREFDEMEEC

Figura 20. Obtención de la secuencia NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Awt₍₁₋₅₄₎. **A.** Electroforesis del fragmento de 2055 pb de la región genética de NS3-NS4A. Control positivo de la reacción (fragmento de 323 pb (kanamycin mRNA, Promega)), carril 1; marcador de masa molecular Lambda DNA/HindIII 2 (Fermentas) (Anexo 2), carril 2; producto amplificado de 2055 pb del gen completo para NS3 y NS4A, carril 3. **B.** Restricción enzimática del vector de expresión pX-NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Awt₍₁₋₅₄₎. Marcador de masa molecular Lambda DNA/HindIII 2 (Fermentas) (Anexo 2), carril 1; secuencia PinPoint Xa-3 (plásmido vacío) con enzima de restricción XmaI, carril 2; vector de expresión pX-NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Awt₍₁₋₅₄₎ con enzima de restricción Bsu15I, carril 3; vector de expresión pX-NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Awt₍₁₋₅₄₎ con enzima de restricción XmaI, carril 4. **C.** Secuencia de aminoácidos de NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Awt₍₁₋₅₄₎. Se muestran subrayados los residuos de NS3 y NS4A que participan en la unión entre estas proteínas y en la función de la proteína NS3-4A. Con doble tachado aquellos diferentes a la secuencia consenso del VHC-1b.

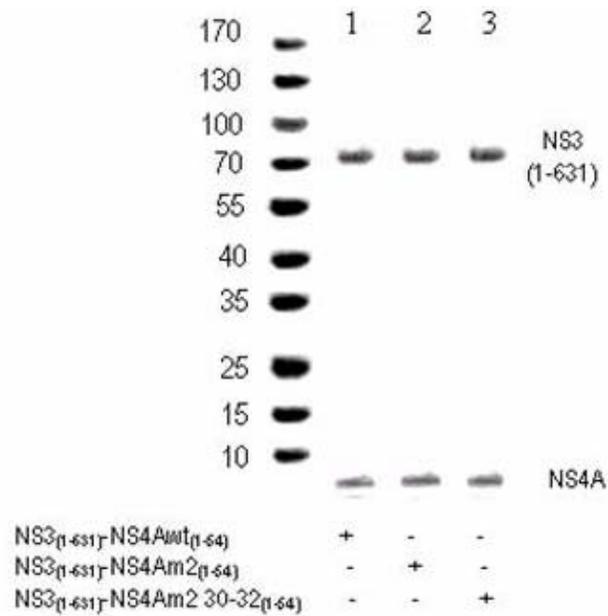
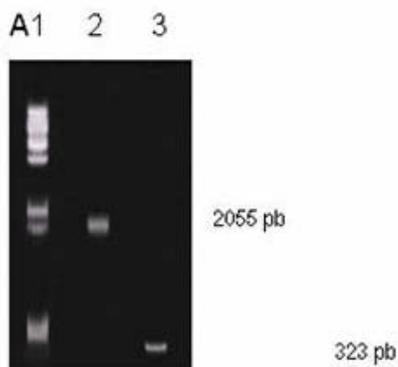


Figura 21. SDS-PAGE de las proteínas expresadas con la secuencia completa de NS3-4A. La pureza de las proteínas expresadas fue de 90% según los ensayos de densitometría aplicados al gel.

Del mismo modo se amplificó un fragmento de 2055 pb a partir de la muestra número 3 que presenta la variante NS4Am2. Este fragmento se clonó (número de acceso: FJ895111) y uso para expresar la proteína NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2₍₁₋₅₄₎ de 70 kDa (Fig. 21; Fig. 22).



B

Secuencia de la proteína NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2₍₁₋₅₄₎

Domino de proteasa de NS3₍₁₋₁₈₁₎

APITAYSQQTRGLLGCIITSLTGRDKNQVEGEVQVSTATQSFLATCVNGVCWTVYHGAGSKTLAAPKGPITQMY
TNVDQDLVGWPKPPGARSLTPCTCGSSDLYLVRHADVIPVRRRGDGRGSLSPRPVSYLKGS~~SG~~GPL~~IC~~PSGHA
VGIFRA~~A~~VCTR~~RG~~VAKAVDFIPVESMETTMS

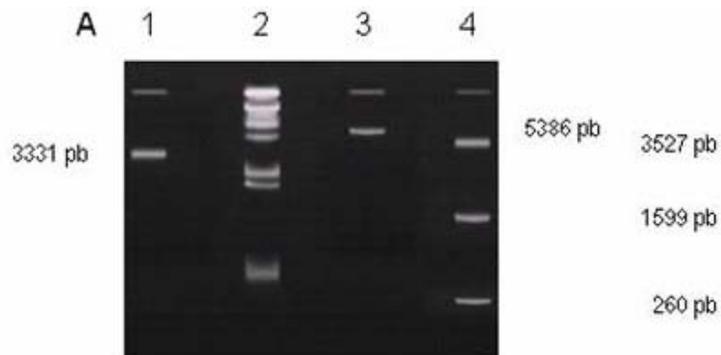
Domino de helicasa de NS3₍₁₈₂₋₆₃₁₎

PVFTDNSSPPAVPQSFQVAHLHAPTGSGKSTKVPAAAYAAQGYKVLVLNPSVAATLSFGSYMSTAHGWEPNIRTGV
 RTWTTGGAVTYSTYKFLADGGCSGGAYDIIICDECHSTDATTILGIGTVLDQAETAGARLVVLLATATPPGSVTV
 DHPNIEEVALS~~E~~TGEVPPFYGKAIPLEVIRGGRHLIFCHSKKKCDELA~~A~~AKLTALGLNAVA~~M~~YRGLDVSVIPTIGDV
 VVVATEALMTGYTGDFDSDVDCNTCVTQTVDFSLDPTFT~~I~~ETT~~L~~PQDAVSRSQRRGRTGRGK~~H~~GIYRFV~~A~~PGER
 PSGMFDSSVLCECYDAGCAWYELTPAETTVRLRAYLNTPLPVCQDHLEFWE~~S~~VFTGLTHIDAHFLSQTKQ~~A~~GDN
 FPYLVAYQATVCARAQAPPPSWDQMWKCLIRLKPTLHGPTPLLYRLGAVQNEITTTHTP~~I~~TKYIM~~A~~CMSADLEVVT
 Proteína NS4A₍₁₋₅₄₎
 STWVLVGGVLAALAAAYCLTTGS~~I~~V~~C~~VGRIS~~T~~LGRPW~~I~~I~~I~~PDRELLYQEFDEMEEC

Figura 22. Variante NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2₍₁₋₅₄₎. **A.** Electroforesis del producto de PCR de la región de NS3-NS4A. Marcador de masa molecular Lambda DNA/HindIII 2 (Fermentas) (Anexo 2), carril 1; producto amplificado del gen completo para NS3 y NS4A, carril 2; control positivo de la reacción (fragmento de 323 pb (kanamycin mRNA, Promega)), carril 3. **B.** Secuencia de aminoácidos de la proteína NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2₍₁₋₅₄₎. Se muestran subrayados los residuos de NS3 y NS4A que participan en la unión entre estas proteínas y en la función de la proteína NS3-4A. Con doble tachado aquellos diferentes a la secuencia consenso del VHC-1b.

Las secuencias obtenidas de NS3 (NS3₍₁₋₆₃₁₎ y NS3_1b₍₁₋₆₃₁₎) mostraron 95% de similitud con la secuencia consenso del VHC-1b (aislado HCV-BK; Simmonds y cols. 1993). Las diferencias que existen en la secuencia de estas proteínas no pertenecen a ninguna región funcional de la proteasa (Fig. 20, Fig. 22).

Con el fin de comprobar el efecto que los cambios V23I y I25C de NS4A generan sobre la actividad proteolítica de NS3-4A, se construyó la variante NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2 30-32₍₁₋₅₄₎ de la proteína completa. La secuencia NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2₍₁₋₅₄₎ que contiene los cambios V23I, I25C, I30S, L31T, S32L en la región central de NS4A se modificó conservando solo las sustituciones I30S, L31T, S32L. El vector de expresión pX-NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2 30-32₍₁₋₅₄₎ produjo una proteína de la masa molecular calculada (Fig. 21, carril 3; Fig. 23).



B

Secuencia de la proteína NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2 30-32₍₁₋₅₄₎

Domino de proteasa de NS3₍₁₋₁₈₁₎

APITAYSQQTRGLLGCIITSLTGRDKNQVEGEVQVSTATQSF~~L~~ATCVNGVCWTVYHGAGSKTLAAPKGPITQMY
TNVDQDLVGWPKPPGARSLTPCTCGSSDLVLRHADVIPVRRRGDGRGSLSPRPVSYLKGS~~S~~GGPL~~L~~CP~~S~~GHA
VGIFRAAVCTRGVAKAVDFIPVESMETTMS

Domino de helicasa de NS3₍₁₈₂₋₆₃₁₎

PVFTDNSSPPAVPQSFQVAHLHAPTGS~~G~~KSTKVPAAAYAAQGYKVLVNLNPSVAATLSFGSYMSTA~~H~~GWEPNIRTGV
RTWTTGGAVTYSTY~~G~~KFLADGGCSGGAYDIIICDECHSTDATTILGIGTVLDQAETAGARLVVLATATPPGSVTV
DHPNIEEVALS~~E~~TGEVFPFYGKAIPLEVIRGGRHLIFCHSKKKCDELA~~A~~KLTA~~L~~GLNAVA~~M~~YRGLDVS~~V~~IPTIGDV
VVVATEALMTGYTGDFDSVIDCNCVTQTVD~~F~~SLDPTFT~~E~~ETTLPQDAVSR~~S~~ORRGR~~T~~GRGK~~H~~GIYRFV~~A~~PGER
PSGMFDSSVLCECYDAGCAWYELTPAETTVRLRAYLNTPLPVCQDHLEF~~W~~ESVFTGLTHIDA~~H~~FLSQTK~~Q~~AGDN
FPYLVAYQATVCARAQAPPPSUDQMUKCLIRLKPTLHGPTLLYRLGAVQNEITTT~~H~~PT~~L~~TKYIM~~A~~CHSADLEVVT

Proteína NS4Am2 30-32₍₁₋₅₄₎

STWVLVGGVLAALAA~~Y~~CLTTGSVVIVGRIS~~T~~LGRPW~~I~~IPDRELLYQEFDEMEEC

Figura 23. Obtención de la secuencia para NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2 30-32₍₁₋₅₄₎. **A.** Restricción enzimática del plásmido de expresión pX-NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2 30-32₍₁₋₅₄₎. Plásmido PinPoint Xa-3 (vacío) con enzima de restricción XmaI, carril 1; marcador de masa molecular Lambda DNA/HindIII 2 (Fermentas) (Anexo 2), carril 2; plásmido de expresión pX-NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2 30-32₍₁₋₅₄₎ con enzima de restricción Bsu15I, carril 3; plásmido de expresión pX-NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2 30-32₍₁₋₅₄₎ con enzima de restricción XmaI, carril 4. **B.** Secuencia de aminoácidos de la variante NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2 30-32₍₁₋₅₄₎. Se muestran subrayados los residuos de NS3 y NS4A que participan en la unión entre estas proteínas y en la función de la proteína NS3-4A. Con doble tachado aquellos diferentes a la secuencia consenso del VHC-1b.

6.4.1. Actividad proteolítica de variantes de la proteína completa NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎

Se determinó que las sustituciones V23I y I25C en la secuencia de NS4A provocan en la proteína completa, un efecto similar al observado en los experimentos con la cadena única de aminoácidos. Previos reportes han mostrado la eficacia del modelo de cadena única para el estudio de la proteasa NS3-4A del VHC (Sali y cols. 1998, Taremi y cols. 1998; Howe y cols. 1999; Sardana y cols. 1999; Leyssen y cols. 2000; Kou y cols. 2007; Beran & Pyle 2008).

La proteína NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Awt₍₁₋₅₄₎ con la secuencia silvestre de NS4A procesó 81% del sustrato, mientras que NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2₍₁₋₅₄₎ que contiene cinco cambios en la región central de NS4A (V23I, I25C, I30S, L31T, S32L) procesó el 47% (Fig. 24). La estrategia para restaurar la actividad proteolítica de esta proteína mostró que el cambio de los residuos 23 y 25 provocó el efecto

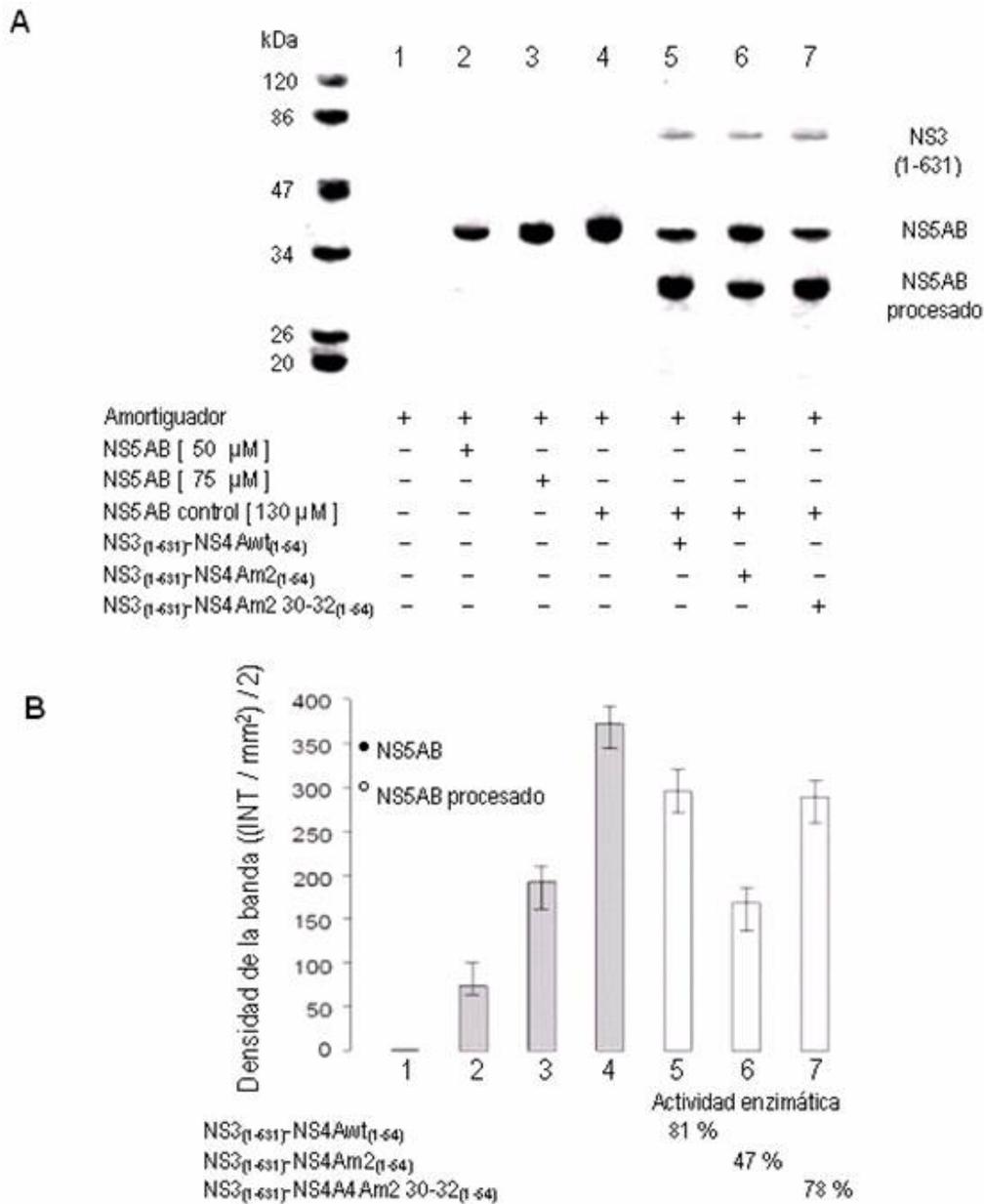


Figura 24. Actividad enzimática de variantes de la proteína NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎. **A.** SDS-PAGE al 12% de los productos de la reacción enzimática usando la proteína NS5AB como sustrato y las variantes indicadas de NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎. **B.** Cuantificación de la actividad enzimática (Densidad de la banda de NS5AB procesado / Densidad de la banda de NS5AB control x 100). Cada valor representa al menos tres experimentos como el mostrado en 24A.

esperado, ya que la proteína NS3₍₁₋₆₃₁₎-4Am2 30-32₍₁₋₅₄₎ procesó 78% de sustrato similar a la proteína con la secuencia silvestre de NS4A (Fig. 24, carriles 5 y 7).

Los resultados obtenidos utilizando proteínas con la secuencia completa y variantes de la cadena única de aminoácidos muestran que los cambios V23I y I25C en NS4A limitan la actividad proteolítica de NS3-4A y que este efecto de NS4A es independiente del dominio de helicasa de NS3.

6.5. Determinación de las características de la proteína NS4A que limitan la actividad de proteasa de NS3-4A del VHC

Se analizó la secuencia de la región central (aminoácidos 21-32) de todas las variantes de NS4A reportadas en el banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

Se determinó por alineamiento de las secuencias 21-32 de NS4A que esta región puede dividirse en dos áreas en base al grado de conservación que presenta. El área denominada A que abarca los aminoácidos 21-28 presenta una conservación del 50% y el resto que corresponde al extremo C-terminal (aminoácidos 29-32) se denominó área B la cual es 1% conservada entre los diferentes subtipos de VHC (Cuadro 6).

El análisis estructural GOR-Threading de las secuencias de NS4A mostró que existe variación en el número de residuos que forman la cadena beta con la que se une a NS3, sin embargo se determinó que la estructura beta de NS4A abarca una región mínima comprendida entre los residuos 21-27 independientemente del subtipo de VHC de que se trate (Fig. 25). Consistente con la determinación previa, en la que se dividió la secuencia de NS4A en dos áreas, la región mínima que forma la cadena beta de NS4A esta comprendida dentro de los límites del área A.

La secuencia de la región mínima 21-27 presentó cierta variación según el subtipo de VHC, las posiciones 22 y 24 en algunos subtipos virales presentan sustituciones, generalmente V-S, lo cual representa un cambio en la naturaleza hidrófoba de esa posición pero no modifica la estructura beta de la región mínima 21-27 (Cuadro 6; Fig. 25). En base a estas observaciones se denominó Región Mínima Beta (RMB) a los aminoácidos 21 a 27 de NS4A, los cuales generan la estructura beta de unión a NS3 y es constante en todos los subtipos virales de VHC.

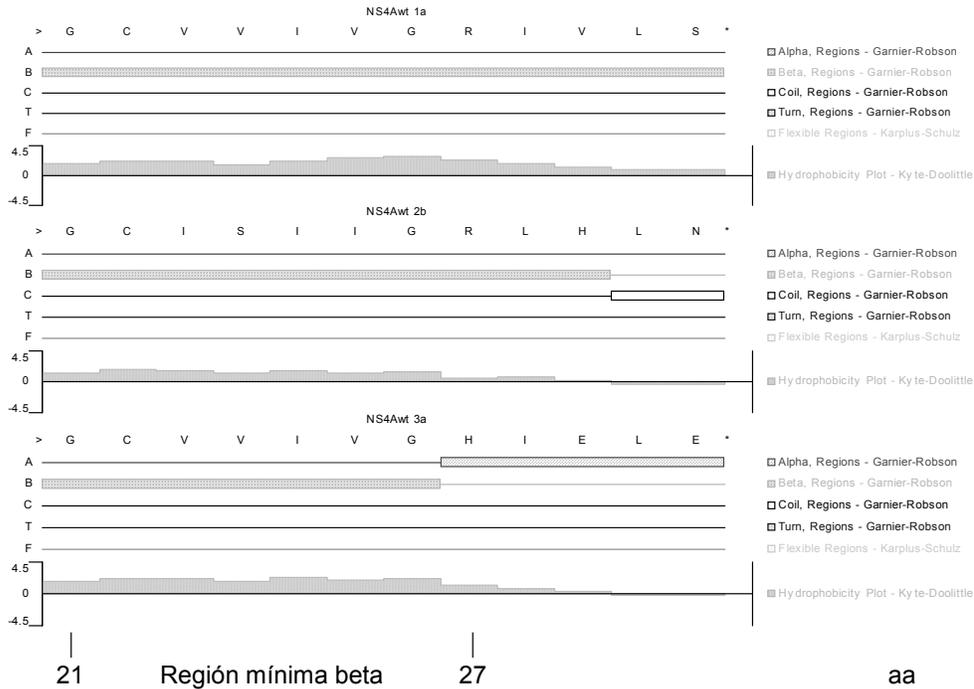
Con estos datos se estableció que las variantes de NS4A que limitan la actividad proteolítica de NS3-4A (variantes NS4Am2 y NS4Am2 23,25) presentan en común una cadena beta mas corta en la RMB. El análisis estructural GOR-Threading mostró que la estructura beta de las variantes NS4Am2 y NS4Am2 23,25 se forma a partir del residuo 22 lo que representa un acortamiento en el N-terminal de la RMB (Fig. 26).

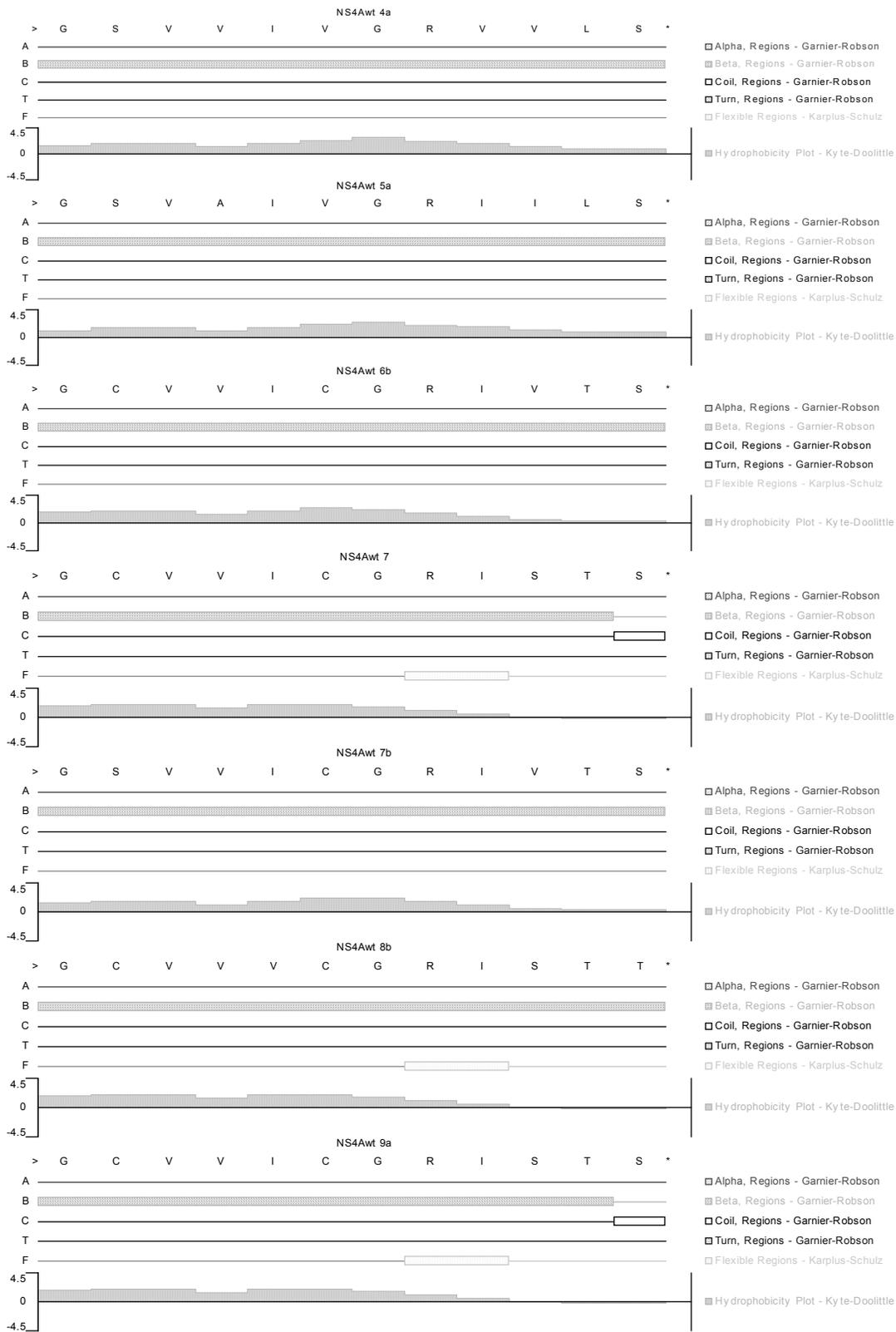
Cuadro 6. Secuencias representativas de la región 21-32 de la proteína NS4A de diferentes subtipos de VHC.

Subtipo de VHC	Región central de NS4A*
1a	21 - G C V V I V G R I V L S - 32
1b	21 - G S V V I V G R I I L S - 32
2b	21 - G C I S I I G R L H L N - 32
3a	21 - G C V V I V G H I E L E - 32
4a	21 - G S V V I V G R V V L S - 32
5a	21 - G S V A I V G R I I L S - 32
6b	21 - G C V V I C G R I V T S - 32
7	21 - G C V V I C G R I S T S - 32
7b	21 - G S V V I C G R I V T S - 32
8b	21 - G C V V V C G R I S T T - 32
9a	21 - G C V V I C G R I S T S - 32
10a	21 - G S V V I V G H L V L G - 32
11a	21 - G S V V I C G R I T T S - 32
dh	21 - G S I V C V G R I S T L - 32

| Área A | Área B |

* La secuencia de aminoácidos de la región 21-32 de NS4A se muestra en código de una sola letra.





21

Región mínima beta

27

aa

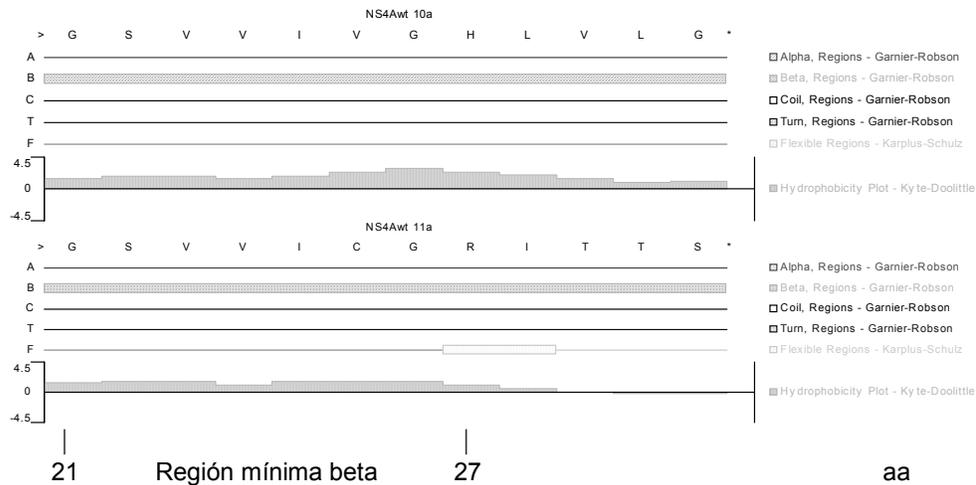


Figura 25. Esquema del análisis de predicción estructural GOR-Threading de diferentes subtipos de NS4A. Secuencias representativas de cada subtipo de NS4A forman en la región 21-27 la cadena beta de unión a NS3. La estructura del subtipo VHC-1b se muestra en la figura 26 (NS4Awt). A, hélice alfa; B, cadena beta; C, asa; T, giro; F, región flexible; H, índice hidrófobo; aa, aminoácido.

6.5.1. Diseño de la variante NS4Awt 24

En base a los resultados obtenidos *in vitro* sobre la actividad proteolítica de las variantes generadas de NS3-4A y las características determinadas *in silico* de diferentes secuencias de NS4A, se diseñó una secuencia de NS4A con el acortamiento N-terminal en la RMB.

Se generó la variante NS4Awt 24, en la cual se usó como secuencia base los aminoácidos de NS4Awt que promueven la unión natural entre NS3 y NS4A. El acortamiento N-terminal en la RMB fue inducido al cambiar el residuo de la posición 24 que en la secuencia silvestre de NS4A es valina, por cisteína utilizando el método adaptado en el presente proyecto para generar variantes de NS4A. De esta forma la secuencia obtenida para la variante NS4Awt 24 conserva la naturaleza hidrófoba y los residuos 23V, 25I, 28R, 29I, 31L que le permiten interactuar con la proteasa (Kim y cols. 1996; Bartenschlager 1999). El cambio en la posición 24 por el aminoácido seleccionado (cisteína) genera *in silico* una cadena beta con el acortamiento N-terminal en la misma posición que las variantes de NS4A que limitan la actividad proteolítica de NS3-4A (Fig. 26).

6.5.2. Obtención de la variante NS4Awt 24₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎

La secuencia determinada para la variante NS4Awt 24 se construyó por ensayos de biología molecular y se insertó en el vector de expresión PinPoint Xa-3 obteniéndose la secuencia pX-NS4Awt 24₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ (Fig. 27).

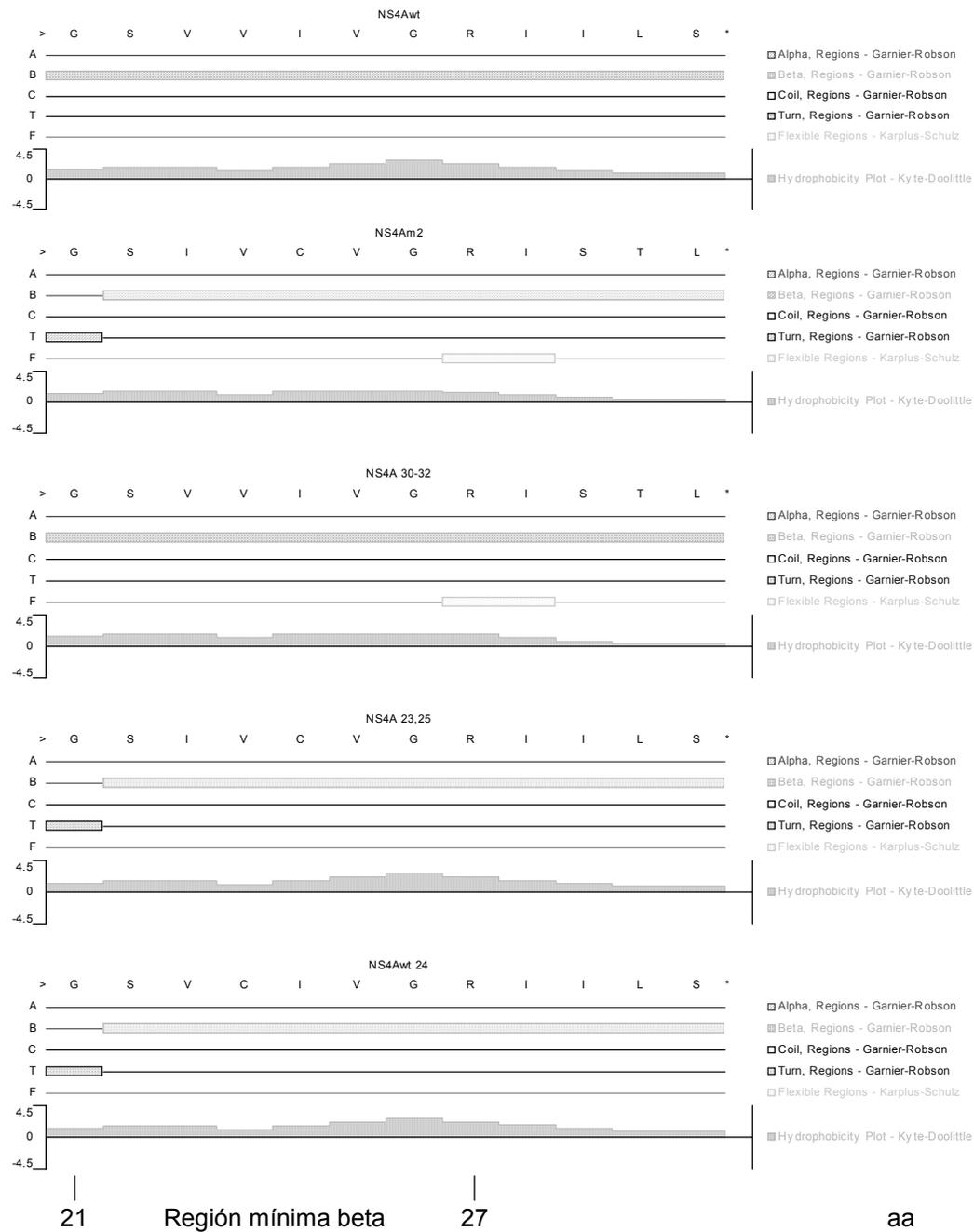


Figura 26. Esquema del análisis de predicción estructural GOR-Threading de las variantes de NS4A expresadas. Las variantes NS4Am2, NS4Am2 23,25 y NS4Awt 24 que disminuyen la actividad proteolítica de NS3-4A muestran en común un acortamiento en la región mínima beta. La variante expresada NS4Awt representa la secuencia del subtipo VHC-1b. A, hélice alfa; B, cadena beta; C, asa; T, giro; F, región flexible; H, índice hidrófobo; aa, aminoácido.

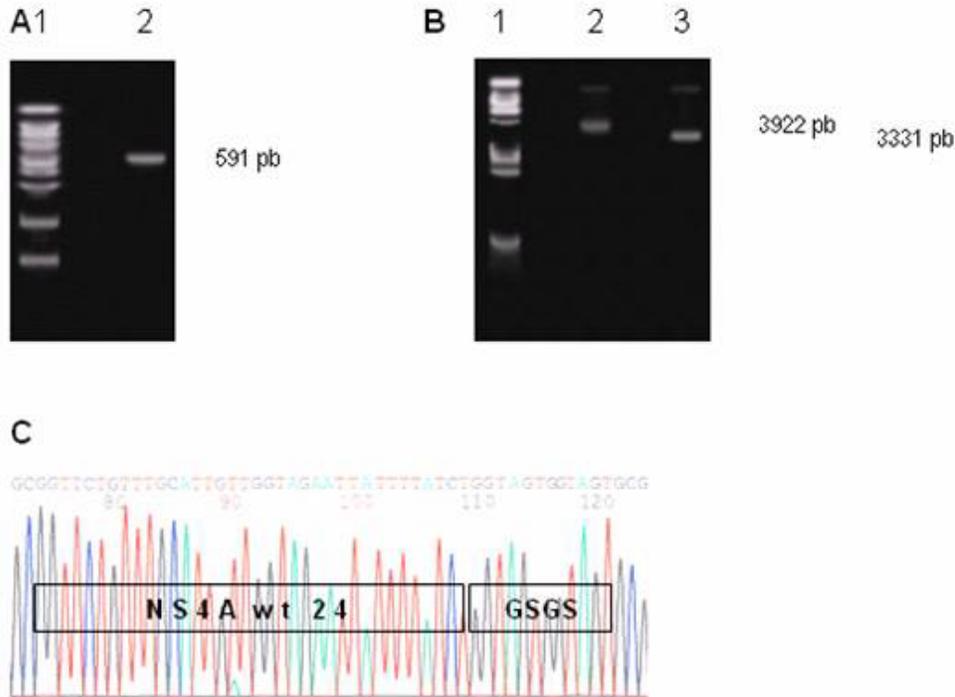


Figura 27. Obtención de la variante NS4Awt 24₍₂₁₋₃₂₎-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎. **A.** Electroforesis del producto de PCR de 591 pb para construir la proteína NS4Awt 24₍₂₁₋₃₂₎-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎. Marcador de masa molecular O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) (Anexo 2), carril 1; fragmento de 591 pb, carril 2. **B.** Restricción enzimática de la secuencia del vector pX-NS4Awt 24₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎. Marcador de masa molecular Lambda DNA/HindIII 2 (Fermentas) (Anexo 2), carril 1; vector pX-NS4Awt 24₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ con enzima de restricción Bsu15I carril 2; secuencia PinPoint Xa-3 (plásmido vacío) con enzima de restricción Bsu15I, carril 3. **C.** Secuencia del vector pX-NS4Awt 24₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎. La secuencia de NS4Awt 24 (bases 74-109) se unió al extremo 5' de la proteasa NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ por medio del asa de cuatro aminoácidos GSGS (bases 110-121).

6.5.3. Actividad proteolítica de NS4Awt 24₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎

La variante NS4Awt 24 que posee el acortamiento N-terminal en la RMB inhibe la actividad proteolítica de NS3-4A del VHC-1b. La proteína NS4Awt 24₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3_1b₍₁₋₁₈₁₎ formada por la secuencia de NS3 del VHC-1b y la secuencia NS4Awt 24 que genera *in silico* el acortamiento de la cadena beta, procesó el 43% del sustrato (Fig. 28). El efecto de esta variante de NS4A sobre la actividad proteolítica de NS3-4A es similar al observado con las variantes NS4Am2 y NS4Am2 23,25. Estos resultados muestran que las variantes de NS4A que presentan *in silico* el acortamiento en el N-terminal de la Región Mínima Beta inhiben la actividad proteolítica de NS3-4A.

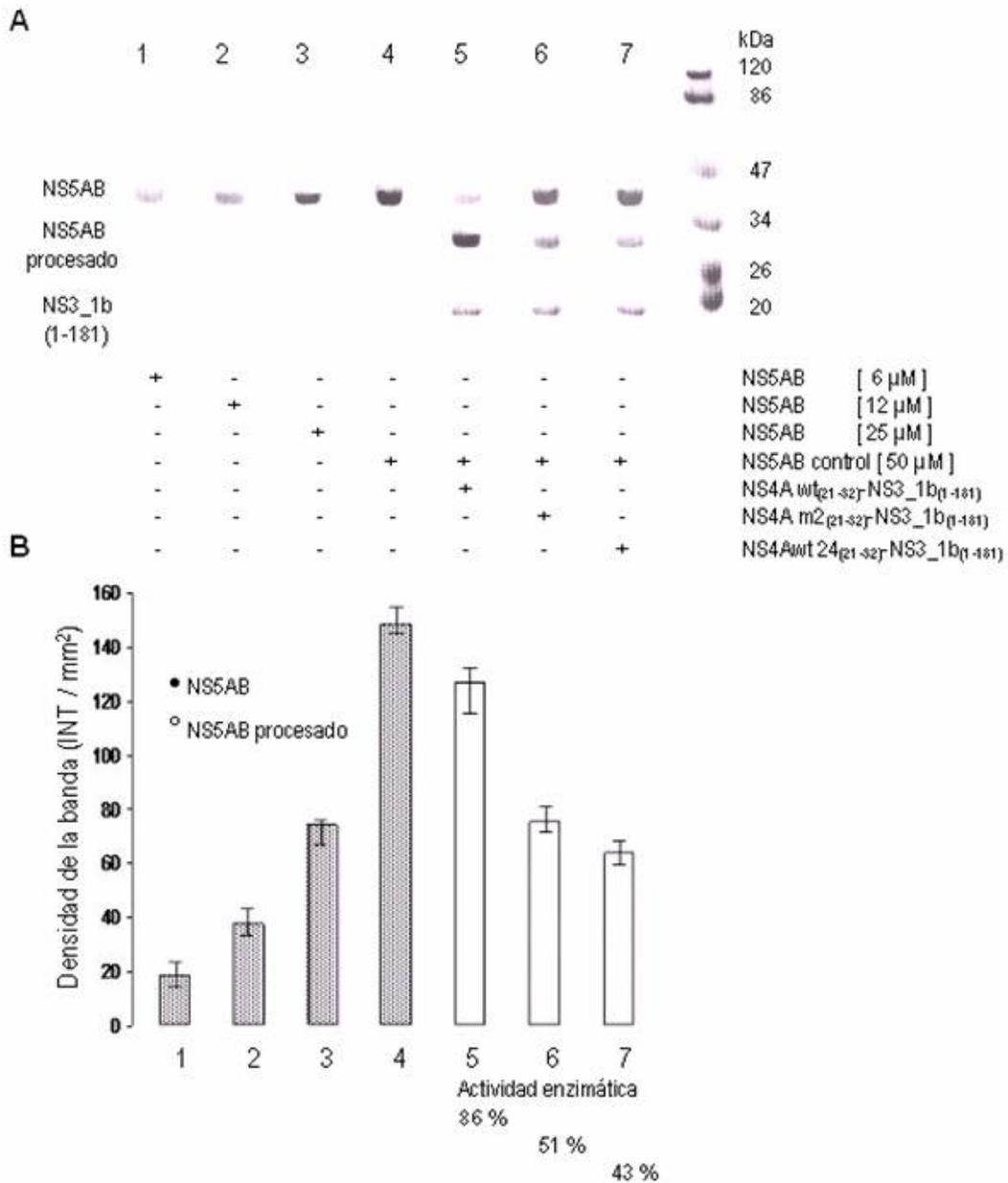


Figura 28. Actividad enzimática de las variantes NS4Awt, NS4Am2 y NS4Awt 24 unidas a la secuencia de NS3_1b del VHC-1b. **A.** SDS-PAGE al 12% del producto de la reacción de diferentes variantes de la cadena única de aminoácidos usando la secuencia de NS3_1b. **B.** Cuantificación de la actividad enzimática de las variantes indicadas a la derecha (Densidad de la banda de NS5AB procesado / Densidad de la banda de NS5AB control x 100). Cada valor representa al menos tres experimentos como el mostrado en 28A.

7. Discusión

En este trabajo se estudió el efecto de variantes de NS4A como inhibidores de la actividad de proteasa de la proteína NS3-4A del VHC. Basado en experimentos realizados con variantes naturales de la proteína NS3-4A así como con secuencias construidas por técnicas de biología molecular, se determinó que los cambios V23I, I25C que generan *in silico* la modificación de la estructura secundaria de NS4A, limitan la actividad proteolítica de NS3-4A. Se estableció que este efecto se obtiene acortando el extremo N-terminal de la cadena beta de NS4A. Esta información se comprobó al construir dos variantes de NS4A las cuales inhiben *in vitro* la actividad proteolítica de NS3-4A sobre la región de corte NS5A/NS5B que provoca la maduración de la polimerasa viral del VHC.

En un grupo de trece aislados de VHC obtenidos de Marzo a Septiembre de 2006 se identificaron dos variantes de NS3-4A que presentan baja actividad proteolítica sobre la región de corte NS5A/NS5B. Estas variantes difieren en la secuencia de la región central de NS4A (aminoácidos 21-32) y se nombraron en base a esta diferencia como NS4Am2 y NS4Am3. NS4Awt se usó para referirse a los once aislados restantes de VHC que presentan la misma secuencia de la región 21-32 de la proteína silvestre NS4A del VHC-1b. El procedimiento utilizado durante su obtención y análisis se basó en el uso de una polimerasa de alta fidelidad que impide la introducción de errores en la secuencia amplificada, varias repeticiones de los experimentos de PCR para confirmar el producto amplificado y múltiples ensayos independientes de clonación, lo cual permite señalar un origen natural de las variantes identificadas NS4Am2 y NS4Am3. Cabe mencionar que los resultados obtenidos por este procedimiento solo mostraron variación en la secuencia de NS4A y no en la de NS3, lo cual sugiere la existencia de quasiespecies del VHC que difieren al menos, en el gen de la proteína NS4A. La presencia de secuencias alternas del VHC dentro de un mismo aislado viral han sido referidas como quasiespecies (Martell y cols. 1992; Bukh y cols. 1995; Vallet y cols. 2005; López-Labrador y cols. 2008).

Diferentes métodos de expresión y análisis de proteínas se han utilizada para estudiar el efecto de NS4A sobre la actividad proteolítica de NS3-4A (Lin y cols. 1995; Shimizu y cols. 1996, Taremi y cols. 1998), sin embargo los resultados obtenidos entre estos reportes y el presente proyecto son consistentes. El método de cadena única de aminoácidos fue seleccionado debido a que en investigaciones de diversa naturaleza genera el mismo resultado que el uso de la proteína completa NS3-4A. (Howe y cols. 1999; Wang y cols. 2004; Beran y Pice 2008; Thibeault y cols. 2009). Se hicieron dos modificaciones principales al método de Taremi y cols. (1998) con el fin de estudiar el efecto de variantes de la secuencia de NS3-4A expresadas como cadena única de aminoácidos, la primera modificación fue la reacción única de PCR usada por el autor para fusionar la secuencia de NS4A a NS3 que se cambió por dos reacciones sucesivas de PCR e iniciadores de la reacción mas pequeños. Esta estrategia permitió introducir cambios en la secuencia de NS4A al intercambiar los

iniciadores, así mismo el proceso de síntesis de iniciadores con menor número de bases permite su producción con menos errores en su secuencia, lo cual incrementa la eficiencia en la obtención de la clona requerida. El menor número de bases de cada iniciador permitió además mayor flexibilidad en los parámetros de temperatura utilizados en el PCR durante la hibridación de la nueva secuencia. La segunda modificación fue la expresión de las proteínas, que se adaptó al sistema de expresión PinPoint Xa-*E. coli* JM109, este sistema produce proteínas biotinilables *in vivo* y permite su purificación a través de un proceso de afinidad biotina-avidina en condiciones no desnaturizantes.

A diferencia del método de replicón que requiere de un largo periodo de tiempo para generar un sistema estable y depende de una secuencia en particular del VHC (Wakita y cols. 2005; Qi y cols. 2009), la estrategia del presente proyecto basada en la expresión de variantes biotiniladas de la cadena única de aminoácidos, representa una alternativa para estudiar el efecto de variantes naturales de NS4A sobre la actividad proteolítica de NS3-4A; mas aún, la selección de la región de corte NS5A/NS5B de la poliproteína viral en la cual la eficiencia proteolítica de NS3-4A depende de NS4A, permitió distinguir diferencias propiciadas por cambios en la secuencia de la proteína.

El análisis *in vitro* de las variantes construidas de la cadena única de aminoácidos mostró que los cinco cambios en la secuencia de NS4Am2 (V23I, I25C, I30S, L31T, S32L) están relacionados con la baja actividad proteolítica que producen en la proteína NS3-4A. Según el método de análisis estructural Chou & Fasman la secuencia de aminoácidos de la región central de NS4Am2 produce una región flexible hacia el extremo C-terminal de su estructura, este cambio se propuso como el origen de la baja actividad proteolítica observada en base a reportes previos donde la cadena beta formada por la región central de NS4A determina la unión con NS3 e incrementa su actividad proteolítica (Bartenschlager y cols. 1995; Kin y cols. 1996; Landro y cols. 1997). Para estudiar más a fondo esta observación se construyeron dos variantes derivadas de NS4Am2. La variante NS4Am2 30-32 posee los cambios en los aminoácidos (I30S, L31T, S32L) que provocan la modificación de su extremo C-terminal y la variante NS4Am2 23,25 posee aquellos (V23I, I25C) que son comunes a NS4Am2 y NS4Am3.

Contrario a la hipótesis original se determinó que la variante con la modificación estructural (NS4Am2 30-32) incrementó la actividad proteolítica de NS3-4A al igual que la secuencia silvestre NS4A del VHC-1b (NS4Awt) lo que hace suponer que los residuos 30-32 no se relacionan directamente con la actividad proteolítica de NS3-4A. Este resultado coincide con el reporte de Shimizu y cols. (1996) en el cual el cambio experimental L-S del residuo 30 no afecta la actividad proteolítica de NS3-4A. Por otra parte se observó que la variante NS4Am2 23,25 disminuyó la actividad proteolítica de NS3-4A al igual que NSAm2 con los cinco cambios, siendo el común en estas dos secuencias los cambios V23I y I25C en NS4A. Hasta este punto las variantes de la cadena única de aminoácidos habían sido expresadas usando la secuencia de NS3 proveniente del mismo genoma del que se obtuvo NS4Am2

(VHC-dh) con el fin de reconstituir un sistema homólogo al obtener ambas secuencias del mismo origen ya que existe variabilidad del VHC aún dentro del mismo aislado (Martell y cols. 1992; Bukh y cols. 1995; Vallet y cols. 2005). Estos experimentos comprobaron de manera importante que: i) la actividad proteolítica de NS3 proveniente del VHC-dh puede incrementarse como previamente se ha reportado, siempre y cuando NS4A presente la secuencia silvestre del VHC-1b y ii) que las variantes de NS4A con los cambios V23I y I25C propician la baja actividad proteolítica en las proteínas que las contienen.

Posteriormente se analizó si la NS4Am2 del VHC-dh tenía capacidad de limitar la actividad proteolítica de una NS3 proveniente de un aislado viral distinto, para este fin se construyeron variantes de la cadena única de aminoácidos formadas por las secuencias de NS4A previamente analizadas y la NS3 obtenida de la muestra número 4, la cual presenta una NS4Awt y un alto porcentaje de similitud con la secuencia NS3 del VHC-1b. Estos experimentos mostraron que NS4Am2 sí produce el mismo efecto en la NS3 de otro subtipo viral, en este caso, la del VHC-1b. Este resultado apoyó la observación previa sobre la relación entre la secuencia de NS4A y la baja actividad proteolítica observada, ya que NS4Am2 generó el mismo efecto en secuencias de NS3 de distintos subtipos.

Recientemente se reportó que el dominio helicasa de NS3 afecta el desempeño de su dominio proteasa y que ciertos cambios que modifican la función de la proteína llegan a contrarrestarse de forma natural por cambios en otra región de la misma (Zhang y cols 2005; Dahl y cols. 2007; Beran & Pyle 2008). Para determinar el efecto de las secuencias analizadas de NS4A en una proteína completa, se expresaron variantes de NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎ formadas por la secuencia completa de NS3 (aminoácidos 1-631) y de NS4A (aminoácidos 1-54). En los ensayos con estas variantes se observó un ligero incremento en el desempeño de la proteasa lo cual es común cuando esta presente el dominio helicasa de NS3 (Taremi y cols. 1998; Howe y cols. 1999; Beran & Pyle 2008), así mismo se comprobó que la cadena única de aminoácidos (NS4A₍₂₁₋₃₂₎-GSGS-NS3₍₁₋₁₈₁₎) con la que se realizó la mayoría de los experimentos, genera la misma respuesta que los ensayos realizados con la proteína completa NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎. Los experimentos con variantes de NS3₍₁₋₆₃₁₎-4A₍₁₋₅₄₎ que poseen el dominio helicasa de NS3 mostraron que los cambios V23I, I25C disminuyen la actividad proteolítica de la proteína en proporción similar a los experimentos con la cadena única de aminoácidos. Esto puede explicarse por la interacción local que ocurre entre NS4A y el dominio de proteasa de NS3 (Kim y cols. 1996; Yan y cols. 1998).

Es interesante observar que las variantes de NS4A que disminuyen la actividad de NS3-4A, tienen en común el residuo 25 diferente a la secuencia consenso del VHC-1b. Previamente se ha determinado que este residuo es susceptible de mutar y altera la actividad proteolítica de NS3-4A induciendo incluso su autoproteólisis (Butkiewicz y cols. 1996; Kou y cols. 2007; Hou y cols. 2009).

Esta información junto con la obtenida en el presente proyecto permite proponer que NS4A, a diferencia de ser una proteína accesoria de NS3 como actualmente se le considera, quizás posea una función reguladora-adaptativa al inducir cambios en la función proteolítica de NS3-4A. Estos cambios pueden alterar la concentración o momento del ciclo replicativo en el que las proteínas que NS3-4A procesa están disponibles para intervenir en el ciclo. En estudios con el modelo de replicón, se ha observado que se promueven mutaciones en las proteínas no estructurales, las cuales al poseer funciones relacionadas con la maquinaria replicativa del virus, le permiten adaptar su replicación al tipo celular utilizado; así mismo la autoproteólisis de NS3-4A es inducida por bajas concentraciones de inhibidor de NS3-4A (Wakita y cols. 2005; Noguchi y cols 2008; Hou y cols. 2009). La regulación de la actividad proteolítica por proteínas accesorias ha sido reportada en otras especies de flavivirus donde los sitios de corte de la poliproteína viral dependen de la proteína accesoria (Falgout y cols. 1991; Arias y cols. 1993; Chambers y cols. 1993; Lin y cols. 1993). Aunque la secuencia de la proteína NS4A del VHC no tiene homología obvia con la de otros miembros de los flavivirus, estas se caracterizan por su naturaleza hidrófoba y estar codificadas inmediatamente en uno de los extremos de la secuencia de la proteasa características que definen a la proteína NS4A del VHC.

Para entender porque las sustituciones V23I, I25C en la secuencia de NS4A disminuyen la actividad de proteasa, se analizaron todas las secuencias reportadas de NS4A de los diferentes subtipos del VHC y las variantes aquí obtenidas. Con estos datos se propuso que la secuencia de la región central de NS4A puede dividirse en dos áreas (A y B) en base al grado de conservación que presenta. Esta determinación es consistente con los datos obtenidos por la cristalografía de NS3-4A (Kim y cols. 1996) ya el área A abarcó los aminoácidos que participan en la unión entre NS3 y NS4A. En el área A también se identificó una región a partir del residuo 21 al 27 y se denominó Región Mínima Beta (RMB), la cual contiene los aminoácidos que forman la cadena beta con la que NS4A se une a NS3. La importancia de la RMB radica en que todos los subtipos de VHC forman la cadena beta de NS4A al menos dentro de esta región. La identificación del área A y la RMB representan nueva información sobre las características establecidas de la región central de NS4A, ya que además de ser aplicable a todas las secuencias reportadas de esta proteína, su uso produce interesantes resultados como se demostró al construir la variante NS4Awt 24.

La predicción de la estructura secundaria de las variantes de NS4A por el método GOR (Garnier-Osguthorpe-Robson) mostró que las secuencias NS4Am2 y NS4Am2 23,25 que limitan la actividad proteolítica de NS3-4A presentan un acortamiento en la RMB ya que la cadena beta de estas variantes inicia en el residuo 22 y no en el 21. Esta característica no se observó previamente con el análisis Chou & Fasman porque el método GOR-Threading además de comparar la secuencia analizada con otras previamente cristalizadas, realiza un análisis de las características particulares de cada residuo en relación a la secuencia estudiada permitiendo calcular diferencias más finas en

una estructura específica. El método GOR facilita observar características significantes entre la estructura secundaria y la función de la proteína, no así el método Chou & Fasman (Ogata y cols. 2003). Si bien estos análisis distan de generar datos que solo se obtienen con complejos análisis de la estructura de una proteína, el número de secuencias analizadas impidió este tipo de ensayos.

Con los resultados obtenidos se propuso que el acortamiento de la cadena beta de NS4A en el extremo N-terminal de la RMB se relaciona con el efecto funcional que NS4Am2 y NS4Am2 23,25 tienen sobre la actividad proteolítica de NS3-4A. Esto se comprobó experimentalmente al construir la variante NS4Awt 24. La secuencia de esta variante conserva las características que le permiten interactuar con NS3 como son: la formación de la cadena beta, la posición y número de residuos que abarca esta estructura en la secuencia silvestre (a excepción del acortamiento N-terminal analizado), la conservación de la naturaleza hidrófoba de la región 21-32, además contiene los residuos V23, I25, G27 e I29 con los que se une a NS3 (Lin y cols. 1995; Kim y cols. 1996; Taremi y cols. 1998). Todas estas características se lograron al sustituir el residuo de la posición 24 y el acortamiento requerido en el N-terminal de la RMB se generó utilizando un residuo de C. La limitada actividad proteolítica que NS4Awt 24 provoca en la proteína NS3-4A, indica que los resultados aquí presentados sobre las características de la región central de NS4A, son útiles en el desarrollo de variantes de NS4A que inhiben la actividad proteolítica de NS3-4A del VHC. Esta información puede contribuir en el desarrollo de compuestos más efectivos contra la infección por el virus de hepatitis C.

8. Conclusiones

- Existen variantes naturales del VHC con actividad proteolítica reducida debido a cambios en la proteína NS4A.
- La proteína NS4Am2 del VHC-dh disminuye la actividad proteolítica de NS3-4A de dos subtipos de VHC.
- Los residuos 21-27 de la proteína NS4A forman una cadena beta en todos los subtipos del VHC.
- La modificación de la cadena beta 21-27 de NS4A inhibe la actividad proteolítica de NS3-4A del VHC.

9. Perspectivas

- Generar un modelo *in vivo* para probar el efecto de las variantes obtenidas de NS4A sobre la actividad de proteasa de NS3-4A del VHC.
- Construir y expresar una proteína que posea otros sitios de corte de la poliproteína del VHC para estudiar su procesamiento por la NS3-4A del VHC-dh.
- Aplicar la estrategia de expresión de variantes de cadena única de aminoácidos a partir de aislados virales desarrollada en este proyecto para analizar la patogenia de otras variantes del VHC.

10. Referencias Bibliográficas

Abe, K., Ikeda, M., Dansako, H., Naka, K. & Kato, N. (2007) Cell culture-adaptative NS3 mutations required for the robust replication of genome full-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res.*, **125**, 88-97.

Arias, C.F., Preugschat, F. & Strauss, J.H. (1993) Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology.*, **193**, 888-899.

Bartenschlager, R., Lohmann, V., Wilkinson, T. & Koch, J.O. (1995) Complex formation between the NS3 serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J. Virol.*, **69**, 7519–7528.

Bartenschlager, R. (1999) The NS3/4A proteinase of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy. *J. Viral Hepat.*, **6**, 165–181.

Beran, R.K. & Pyle A.M. (2008) Hepatitis C viral NS3-4A protease activity is enhanced by the NS3 helicase. *J. Biol. Chem.*, **283**, 29929-29937.

Bogen, S.L., Pan, W., Ruan, S., Nair, L.G., Arasappan, A., Bennett, F., Chen, K.X., Jao, E., Venkatraman, S., Vibulbhan, B., Liu, R., Cheng, K.C., Guo, Z., Tong, X., Saksena, A.K., Girijavallabhan, V. & Njoroge, F.G. (2009) Toward the back-up of Boceprevir (SCH 503034): Discovery of new extended p(4)-capped ketoamide inhibitors of hepatitis C virus NS3 serine protease with improved potency and pharmacokinetic profiles. *J. Med. Chem.*, En prensa.

Bukh, J., Miller, R.H. & Purcell, R.H. (1995) Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin. Liver Dis.*, **15**, 41-63.

Butkiewicz, N.J., Wendel, M., Zhang, R., Jubin, R., Pichardo, J., Smith, E.B., Hart, A.M., Ingram, R., Durkin, J., Mui, P.W., Murray, M.G., Ramanathan, L. & Dasmahapatra, B. (1996) Enhancement of hepatitis C virus NS3 proteinase activity by association with NS4A-specific synthetic peptides: Identification of sequence and critical residues of NS4A for the cofactor activity. *Virology.*, **225**, 328-338.

Chambers, T.J., Nestorowicz, A., Amberg, S.M. & Rice, C.M. (1993) Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J. Virol.*, **67**, 6797-807.

Chayama, K., Tsubota, A., Kobayashi, M., Okamoto, K., Hashimoto, M., Miyano, Y., Koike, H., Kobayashi, M., Koida, I., Arase, Y., Saitoh, S., Suzuki, Y., Murashima, N., Ikeda, K. & Kumada, H.

(1997) Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology.*, **25**, 745-749.

Choo, Q.L., Richman, K.H., Han, J.H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, R. & Barr, P.J. (1991) Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 2451-2455.

Clavel, F. & Hance, A.J. (2004) HIV drug resistance. *N. Engl. J. Med.*, **350**, 1023-1035.

Dahl, G., Sandström, A., Akerblom, E. & Danielson, U.H. (2007) Effects on protease inhibition by modifying of helicase residues in hepatitis C virus nonstructural protein 3. *FEBS J.*, **274**, 5979-5986.

De Andrade, D.R. Jr. & De Andrade, D.R. (2004) The influence on the human genome on chronic viral Hepatitis outcome. *Rev. Inst. Med. Tro. S. Paulo.*, **46**, 119-126.

De Francesco, R., Tomei, L., Altamura, S., Summa, V. & Migliaccio, G. (2003) Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: Inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.*, **58**, 1-16.

Dehesa-Violante, M., Bosques-Padilla, F. & Kershenovich-Stalnikowitz, D. (2007) Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Mexican patients. *Rev. Gastroenterol. Mex.*, **72**, 344-348

Delang, L., Paeshuyse, J., Vliegen, I., Leyssen, P., Obeid, S., Durante, D., Zoulim, F., Op de Beeck, A., & Neyts, J. (2009) Statins potentiate the in vitro anti-hepatitis C virus activity of selective hepatitis C virus inhibitors and delay or prevent resistance development. *Hepatology.*, **49**, 1-11.

Dimasi, N., Pasquo, A., Martin, F., DiMarco, S., Steinküler, C., Cortese, R. & Sollazzo, M. (1998) Engineering, characterization and phage display of hepatitis C virus NS3 protease and NS4A cofactor peptide as a single-chain protein. *Protein Eng.*, **11**, 1257-1265.

Dubuisson, J. (2007) Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol.*, **13**, 2406-2415.

Failla, C., Tomei, L. & De Francesco, R. (1994) Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.*, **68**, 3753-3760.

Falgout B, Pethel M, Zhang Y.M. & Lai C.J. (1991) Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J. Virol.*, **65**, 2467-75.

Galossi, A., Guarisco, R., Bellis, L. & Puoti, C. (2007) Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *J. Gastrointestin. Liver. Dis.*, **16**, 65-73.

Gallinari, P., Paolini, C., Brennan, D., Nardi, C., Steinküler, C. & De Francesco, R. (1999) Modulation of hepatitis C virus NS3 protease and helicase activities through the interaction with NS4A. *Biochemistry.*, **38**, 5620-5632.

Gaudieri, S., Rauch, A., Pfafferott, K., Barnes, E., Cheng, W., McCaughan, G., Shackel, N., Jeffrey, J.P., Mollison, L., Baker, R., Furrer, H., Günthard, H.F., Freitas, E., Humphreys, I., Klenerman, P., Mallal, S., James, I., Roberts, S., Nolan, D. & Lucas, M. (2009) Hepatitis C virus drug resistance and immune-driven adaptations: relevance to new antiviral therapy. *Hepatology.*, **49**, 1069-1082.

Gentile, I., Viola, C., Borgia, F., Castaldo, G. & Borgia, G. (2009) Telaprevir: a promising protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection. *Curr. Med. Chem.*, **16**, 1115-1121.

Giannini, C. & Bréchet, C. (2003) Hepatitis C virus biology. *Cell Death Differ.*, **10**, S27-S38.

Gottwein, J.M., Scheel, T.K., Jensen, T.B., Lademann, J.B., Prentoe, J.C., Knudsen, M.L., Hoegh, A.M. & Bukh, J. (2009) Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: Role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology.*, **49**, 364-377.

Guillou-Guillemette, H.L., Vallet, S., Gaudy-Graffin, C., Payan, C., Pivert, A., Goudeau, A. & Lunel-Fabiani, F. (2007) Genetic diversity of the Hepatitis C virus: Impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol.*, **13**, 2416-2426.

Gutierrez-Reyes, G., Gutierrez-Ruiz, M.C. & Kershenovich, D. (2007) Liver fibrosis and chronic viral hepatitis. *Arch Med Res.*, **38**, 644-651.

Hamill, P. & Jean, F. (2005) Enzymatic characterization of membrane-associated hepatitis C virus NS3-4A heterocomplex serine protease activity expressed in human cells. *Biochemistry.*, **44**, 6586-6596.

Hézode, C., Forestier, N., Dusheiko, G., Ferenci, P., Pol, S., Goeser, T., Bronowicki, J.P., Bourlière, M., Gharakhanian, S., Bengtsson, L., McNair, L., George, S., Kieffer, T., Kwong, A., Kauffman, R.S., Alam, J., Pawlotsky, J.M. & Zeuzem, S. (2009) Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N. Engl. J. Med.*, **360**, 1839-1850.

Hou, X., Yang, W., Zhao, Y., Agarwal, A. & Huang, M. (2009) Internal cleavages of hepatitis C virus NS3 induced by P1 mutations at the NS3/4A cleavage site. *Virology.*, **383**, 271-278.

Houghton, M. & Abrignani, S. (2005) Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature.*, **436**, 961-965.

Howe, A.Y., Chase, R., Taremi, S.S., Risano, C., Beyer, B., Malcolm, B. & Lau, J.Y. (1999) A novel recombinant single-chain hepatitis C virus NS3-NS4A protein with improved helicase activity. *Protein Sci.*, **8**, 1332-1342.

Ikedo, M., Abe, K., Dansako, H., Nakamura, T., Naka, K. & Kato, N. (2005) Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **329**, 1350-1359.

Ismail, N.S.M., El Dine, R.S., Hattori, M., Takahashi, K. & Ihara, M. (2008) Computer based design, synthesis and biological evaluation of novel indole derivatives as HCV NS3-4A serine protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 7877-87.

Kato N. (2001) Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med. Okayama.*, **55**, 133-159.

Kershenovich-Stalnikowitz, D., Jurado-Castelo, L.C., Marín-López, E. & Rivera-Ramos., J.F.J. (2007) Guía clínica de diagnóstico y tratamiento de hepatitis C. *Rev. Gastroenterol. Mex.*, **72**, 181-184.

Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M.D., Landro, J.A., Chambers, S.P., Markland, W., Lepre, C.A., O'Malley, E.T., Harbeson, S.L., Rice, C.M., Murcko, M.A., Caron, P.R. & Thomson, J.A. (1996) Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell.*, **87**, 343-355.

Kou, Y.H., Chang, M.F., Wang, Y.M., Hung, T.M. & Chang, S.C. (2007) Differential requirements of NS4A for internal NS3 cleavage and polyprotein processing of hepatitis C virus. *J. Virol.*, **81**, 7999-8008.

Kwong, A.D., Kim, J.L., Rao, G., Lipovsek, D. & Raybuck, S.A. (1999) Hepatitis C virus NS3/4A protease. *Antiviral Res.*, **41**, 67-84.

Lai, V.C., Zhong, W., Skelton, A., Ingravallo, P., Vassilev, V., Donis, R.O., Hong, Z. & Lau, J.Y. (2000) Generation and characterization of a hepatitis C virus NS3 protease-dependent bovine viral diarrhea virus. *J Virol.*, **74**, 6339-6347.

Landro, J.A., Raybuck, S.A., Luong, Y.P., O'Malley, E.T., Harbeson, S.L., Morgenstern, K.A., Rao, G. & Livingston, D.J. (1997) Mechanistic role of an NS4A peptide cofactor with the truncated NS3 protease of hepatitis C virus: elucidation of the NS4A stimulatory effect via kinetic analysis and inhibitor mapping. *Biochemistry.*, **36**, 9340-9348.

Leyssen, P., De Clercq, E. & Neyts, J. (2000) Perspectives for the treatment of infections with flaviviridae. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**, 67-82.

Li, J. W., Li, K., Jiang, J., Xu, X.L. & Huang, Z.Q. (2006) Construction of eukaryotic expression plasmid containing HCV NS3 segment and protein expression in human HL-7702 hepatocytes. *World J Gastroenterol.*, **12**, 1038-1042.

Lin, C., Amberg, S.M., Chambers, T.J. & Rice, C.M. (1993) Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. *J. Virol.*, **67**, 2327-35.

Lin, C., Thomson, J.A. & Rice, C.M. (1995) A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *J. Virol.*, **69**, 4373-4380.

Lin, C., Lin, K., Luong, Y.P., Rao, B.G., Wei, Y.Y., Brennan, D.L., Fulghum, J.R., Hsiao, H.M., Ma, S., Maxwell, J.P., Cottrell, K.M., Perni, R.B., Gates, C.A. & Kwong, A.D. (2004) In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061, structural analysis indicates different resistance mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **279**, 17508-17514.

Lin, C., Kwong, A.D. & Perni, R.B. (2009) Discovery and development of VX-950, a novel, covalent, and reversible inhibitor of hepatitis C virus NS3.4A serine protease. *Infect. Disord. Drug. Targets.*, **6**, 3-16.

Lin, T.I., Lenz, O., Fanning, G., Verbinnen, T., Delouvroy, F., Scholliers, A., Vermeiren, K., Rosenquist, A., Edlund, M., Samuelsson, B., Vrang, L., de Kock, H., Wigerinck, P., Raboisson, P. & Simmen, K. (2009) In vitro activity and preclinical profile of TMC435350, a potent hepatitis C virus protease inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 1377-1385.

Lindenbach, B.D. & Rice, C.M. (2005) Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature.*, **436**, 933-938.

Locarnini, S. & Warner, N. (2007) Major causes of antiviral drug resistance and implications for treatment of hepatitis B virus monoinfection and coinfection with HIV. *Antivir. Ther.*, **12**, H15-H23.

Lohmann, V., Körner, F., Koch, J.O., Herian, U., Thellmann, L. & Bartenschlager, R. (1999) Replication of subgenomic Hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.*, **285**, 110-113.

López-Labrador, F.X., Moya, A. & González-Candelas, F. (2008) Mapping natural polymorphisms of hepatitis C virus NS3/4A protease and antiviral resistance to inhibitors in worldwide isolates. *Antivir. Ther.*, **13**, 481-494.

Macdonald, A. & Harris, M. (2004) Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J. Gen. Virol.*, **85**, 2485-502.

Manns, M.P., Wedemeyer, H. & Cornberg, M. (2006) Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut.*, **55**, 1350-1359.

Martell, M., Esteban, J.I., Quer, J., Genescà, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J. & Gómez, J. (1992) Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J. Virol.*, **66**, 3225-3229.

McHutchison, J.G., Everson, G.T., Gordon, S.C., Jacobson, I.M., Sulkowski, M., Kauffman, R., McNair, L., Alam, J. & Muir, A.J. (2009) Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.*, **360**, 1827-1838.

Mederacke, I., Wedemeyer, H. & Manns, M.P. (2009) Boceprevir, an NS3 serine protease inhibitor of hepatitis C virus, for the treatment of HCV infection. *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, **10**, 181-189.

Miura, K., Taura, K., Kodama, Y., Schnabl, B. & Brenner, D.A. (2008) Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity *Hepatology.*, **48**, 1420-1429.

Morgenstern, K.A., Landro, J.A., Hsiao, K., Lin, C., Gu, Y., Su, M.S. & Thomson, J.A. (1997) Polynucleotide modulation of the protease, nucleoside triphosphatase, and helicase activities of a hepatitis C virus NS3-NS4A complex isolated from transfected COS cells. *J. Virol.*, **71**, 3767-3775.

Noguchi, T., Otsubaki, T., Ando, I., Ogura, N., Ikeda, S. & Shimotohno, K. (2008) Isolation and gene analysis of interferon α -resistant cell clones of the hepatitis C virus subgenome. *Virology*, **375**, 424–432.

Ogata, S., Florese, R.H., Nagano-Fujii, M., Hidajat, R., Deng, L., Ku, Y., Yoon, S., Saito, T., Kawata, S. & Hotta, H. (2003) Identification of hepatitis C virus (HCV) subtype 1b strains that are highly, or only weakly, associated with hepatocellular carcinoma on the basis of secondary structure of an amino-terminal portion of the HCV NS3 protein. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2835-2841.

Pawlotsky, J.M. (2003) Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin. Liver Dis.*, **7**, 45-66.

Pawlotsky, J.M. (2004) Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol.*, **12**, 96-102.

Penin, F. (2003) Structural biology of hepatitis C virus. *Clin. Liver Dis.*, **7**, 1-21.

Poo, J.L., Sánchez, F., Kershenovich, D., García, X., Torres-Ibarra, R., Góngora, J., Cano, C., Parada, M. & Uribe, M. (2008) Efficacy of triple therapy with thymalfasin, peginterferon alpha-2a, and ribavirin for the treatment of hispanic chronic HCV nonresponders. *Ann Hepatol.*, **7**, 369-375.

Preugschat, F., Yao, C.W. & Strauss, J.H. (1990) In vitro processing of dengue virus type 2 nonstructural proteins NS2A, NS2B, and NS3. *J. Virol.*, **64**, 4364-4374.

Qi, X., Bae, A., Liu, S., Yang, H., Sun, S.C., Harris, J., Delaney, W., Miller, M. & Mo, H. (2009) Development of a replicon-based phenotypic assay for assessing the drug susceptibilities of HCV NS3 protease genes from clinical isolates *Antiviral Research.*, **81**, 166–173.

Rajagopalan, R., Misialek, S., Stevens, S., Myszka, D., Brandhuber, B., Ballard, J., Andrews, S., Seiwert, S. & Kossen, K. (2009) Inhibition and binding kinetics of the hepatitis c virus ns3 protease inhibitor ITMN-191 reveals tight binding and slow dissociative behavior. *Biochemistry.*, En prensa.

Rychlowska, M. & Bienkowska-Szewczyk, K. (2007). Hepatitis C - New developments in the studies of the viral life cycle. *Acta Biochim Pol.*, **54**, 703-715.

Sali, D.L., Ingram, R., Wendel, M., Gupta, D., McNemar, C., Tsarbopoulos, A., Chen, J.W., Hong, Z., Chase, R., Risano, C., Zhang, R., Yao, N., Kwong, A.D., Ramanathan, L., Le, H.V. & Weber, T.

P.C. (1998) Serine protease of hepatitis C virus expressed in insect cells as the NS3/4A complex. *Biochemistry*, **37**, 3392-3401.

Sardana, V.V., Blue, J.T., Zugay-Murphy, J., Sardana, M.K. & Kou, L.C. (1999) An uniquely purified HCV NS3 protease and NS4A (21-34) peptide form a highly active serine protease complex in peptide hydrolysis. *Protein Expr. Purif.*, **16**, 440-447.

Sarrazin, C., Mihm, U., Hermann, E., Welsch, C., Albrecht, M., Sarrazin, U., Traver, S., Lengauer, T. & Zeuzem, S. (2005) Clinical significance of in vitro replication enhancing mutations of the hepatitis C virus replicon in patients with chronic hepatitis C. *J. Infect. Dis.*, **192**, 1710-1719.

Satoh, S., Tanji, Y., Hijikata, M., Kimura, K. & Shimotohno, K. (1995) The N-terminal region of hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3) is essential for stable complex formation with NS4A. *J. Virol.*, **69**, 4255-4260.

Seiwert, S., Hong, J., Lim, S., Tan, H., Kossen, K. & Blatt, L. (2006) Sequence variation of NS3 and NS4A in hepatitis C virus (HCV) replicons following exposure to ITMN-191 concentrations likely to encompass those achieved in human liver following clinical dosing. 1st International Workshop on Hepatitis C Resistance & New Compounds, Boston, MA.

Shimizu, Y., Yamaji, K., Masuho, Y., Yokota, T., Inoue, H., Sudo, K., Satoh, S. & Shimotohno, K. (1996) Identification of the sequence on NS4A required for enhanced cleavage of the NS5A/NS5B site by the hepatitis C virus NS3 protease. *J. Virol.*, **70**, 127-132.

Simmonds, P., Holmes, E.C., Cha, T.A., Chan, S.W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P.L., Kolberg, J. & Urdea, M.S. (1993) Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J. Gen. Virol.*, **74**, 2391-2399.

Steinkühler, C., Urbani, A., Tomei, L., Biasiol, G., Sardana, M., Bianchi, E., Pessi, A. & De francesco, R. (1996) Activity of purified Hepatitis C virus protease NS3 on peptide substrates. *J. Virol.*, **70**, 6694-6700.

Tanji, Y., Hijikata, M., Satoh, S., Kaneko, T. & Shimotohno, K. (1995) Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *J. Virol.*, **69**, 1575-1581.

Taremi, S.S., Beyer, B., Maher, M., Yao, N., Prorise, W., Weber, P.C. & Malcolm, B.A. (1998) Construction, expression, and characterization of a novel fully activated recombinant single-chain hepatitis C virus protease. *Protein Sci.*, **7**, 2143-2149.

Taylor, D.R., Puig, M., Darnell, M.E.R., Mihalik, K. & Feinstone, S.M. (2005) New antiviral pathway mediates Hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1. *J. Virol.*, **79**, 6291-6298.

Thibeault, D., Massariol, M.J., Zhao, S., Welchner, E., Goudreau, N., Gingras, R., Lina's-Brunet, M. & White, P.W. (2009) Use of the fused NS4A peptide-NS3 protease domain to study the importance of the helicase domain for protease inhibitor binding to hepatitis C virus NS3-NS4A. *Biochemistry.*, **48**, 744–753.

Tong, X., Chase, R., Skelton, A., Chen, T., Wright-Minogue, J. & Malcolm, B.A. (2006) Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034. *Antiviral Res.*, **70**, 28–38.

Valdespino, J.L., Conde-González, C.J., Olaiz-Fernández, G., Palma, O., Kershenovich, D. & Sepúlveda, J. (2007) Seroprevalencia de la hepatitis C en adultos de México: ¿un problema de salud pública emergente?. *Salud Pública Mex.*, **49**, S395-S403.

Vallet, S., Gouriou, S., Noursbaum, J.B., Legrand-Quillien, M.C., Goudeau, A. & Picard, B. (2005) Genetic heterogeneity of the NS3 protease gene in hepatitis C virus genotype 1 from untreated infected patients. *J. Med. Virol.*, **75**, 528-537.

Vanwolleghem, T., Meuleman, P., Libbrecht, L., Roskams, T., De Vos, R. & Leroux-Roels, G. (2007) Ultra-rapid cardiotoxicity of the hepatitis C virus protease inhibitor BILN 2061 in the urokinase-type plasminogen activator mouse. *Gastroenterology.*, **133**, 1144-1155.

Villano, S., Howe, A., Raible, D., Harper, D., Speth, J. & Bichler, G. (2006) Analysis of HCV NS5B genetic variants following monotherapy with HCV-796, a nonnucleoside polymerase inhibitor, in treatment-naïve HCV-infected patients. *Hepatology.*, **44**, 607A– 608A.

Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. & Liang, T.J. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.*, **11**, 791-796.

Wang, W., Lahser, F.C., Yi, M., Wright-Minogue, J., Xia, E., Weber, P.C., Lemon, S.M. & Malcolm, B.A. (2004) Conserved C-terminal Threonine of hepatitis C virus NS3 regulates autoproteolysis and prevents product inhibition. *J. Virol.*, **78**, 700-709.

Windisch, M., Frese, M., Kaul, A., Trippler, M., Lohmann, V. & Bartenschlager, R. (2005) Dissecting the interferon-induced inhibition of hepatitis C virus replication by using a novel host cell line. *J. Virol.*, **79**, 13778-13793.

Wohnsland, A., Hofmann, W.P., Sarrazin, C. (2007) Resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin. Microbiol. Rev.*, **20**, 23-38.

Yan, Y., Li, Y., Munshi, S., Sardana, V., Cole, J.L., Sardana, M., Steinkühler, C., Tomei, L., De Francesco, R., Kuo, L.C. & Chen, Z. (1998) Complex of NS3 protease and NS4A peptide of BK strain hepatitis C virus: a 2.2 Å resolution structure in a hexagonal crystal form. *Protein Sci.*, **7**, 837-847.

Zhang, C., Cai, Z., Kim, Y.C., Kumar, R., Yuan, F., Shi, P.Y., Kao, C. & Luo, G. (2005) Stimulation of hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 3 (NS3) helicase activity by the NS3 protease domain and by HCV RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.*, **79**, 8687-97.

Zemel, R., Gerechet, S., Greif, H., Bachmatove, L., Birk, Y., Golan-Goldhirsh, A., Kunin, M., Berdichevsky, Y., Benhar, I. & Tur-Kaspa, R. (2001) Cell transformation induced by hepatitis C virus NS3 serine protease. *J. Viral Hepat.*, **8**, 96-102.

11. Anexos

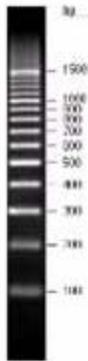
11.1. Secuencia de iniciadores

Fragmento de ADN	Iniciador
	S
	A
<hr/>	
NS3	cgactctcgcgccatcacg gaccggagaccgcatagtag
NS4A	cggctaaagcctacgctgc gaggatctgagttacacgtgctgc
NS5AB ₍₂₂₅₈₋₂₆₂₂₎	gagagctcatcgaaggtgccaggtcgggctcaaccaat ctcagcgatatctcacgtcagctgcaggcttctctacg
NS3 ₍₁₋₁₈₁₎	gagagctcatcgaaggtcgcgcctatcacggcc ctcagcgatatctcaagaccgcatgtag
NS4Awt ₍₂₁₋₃₂₎ -NS3 ₍₁₋₁₈₁₎	
Fase 1	<u>gttgtagaatttttatctggtagtggtagtcgcctatcacggcctattcc</u> NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ -A
Fase 2	gagagctcatcgaaggtcgcggttctgtttattggtgagaattttatctggtagtggtag NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ -A
NS4Am2 ₍₂₁₋₃₂₎ -NS3 ₍₁₋₁₈₁₎	
Fase 1	<u>gttgtagaatttcactctggtagtggtagtcgcctatcacggcctattcc</u> NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ -A
Fase 2	gagagctcatcgaaggtcgcggttctgtttattggtgagaatttcactctggtagtggtag NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ -A
NS4Am2 30-32 ₍₂₁₋₃₂₎ -NS3 ₍₁₋₁₈₁₎	
Fase 1	NS4Am2 ₍₂₁₋₃₂₎ -NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ Fase 1 NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ -A
Fase 2	gagagctcatcgaaggtcgcggttctgtttattggtgagaatttcactctggtagtggtag NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ -A
NS4Am2 23,25 ₍₂₁₋₃₂₎ -NS3 ₍₁₋₁₈₁₎	
Fase 1	NS4Awt ₍₂₁₋₃₂₎ -NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ Fase 1 NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ -A
Fase 2	gagagctcatcgaaggtcgcggttctgtttattggtgagaattttatctggtagtggtag NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ -A
NS4Awt 24 ₍₂₁₋₃₂₎ -NS3 ₍₁₋₁₈₁₎	
Fase 1	NS4Awt ₍₂₁₋₃₂₎ -NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ Fase 1 NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ -A
Fase 2	gagagctcatcgaaggtcgcggttctgtttattggtgagaattttatctggtagtggtag NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ -A

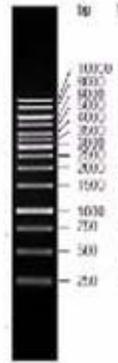
	NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ -A
NS3-NS4A	NS3-S gagcgcttctgcttgaattgctc
NS3 ₍₁₋₆₃₁₎ -NS4A ₍₁₋₅₄₎	NS3 ₍₁₋₁₈₁₎ -S gcacgatatctcagcactctccatttcgaactcc
NS3 ₍₁₋₆₃₁₎ -NS4Am2 30-32 ₍₁₋₅₄₎ Selection Oligonucleotide Top Strand (Promega)	caacaggcagtggtgcatcgtggtagga gataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcg

Anexo 1. Secuencias de los iniciadores utilizados. Los nucleótidos subrayados representan los codones para los residuos de NS4A insertados en cada fase de PCR. S, Sentido; A, Antisentido.

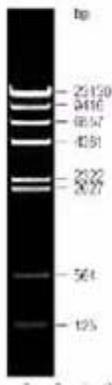
11.2. Marcadores de masa molecular



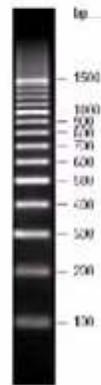
OrangeRuler 100 pb DNA Ladder
(Fermentas)



GeneRuler 1 kb DNA Ladder
(Fermentas)



Lambda DNA/HindIII 2
(Fermentas)



GeneRuler 100 bp DNA Ladder
(Fermentas)

Anexo 2. Marcadores de ADN.

11.3. Publicaciones derivadas de la tesis doctoral

Bermúdez-Aguirre, A.D. (2008) Función de la proteasa NS3 del virus de hepatitis C. *REB.*, **27**, 79-84.

Bermúdez-Aguirre, A.D., Padilla-Noriega, L., Zenteno, E. & Reyes-Leyva, J. (2009) Identification of Amino Acid Variants in the Hepatitis C Virus Non-Structural Protein 4A. *Tohoku J. Exp. Med.*, **218**, 165-175.