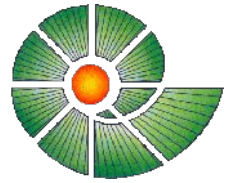




INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGÍA



CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA RIBONUCLEOPROTEÍNA
HETEROGÉNEO NUCLEAR A1 HUMANA

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO

PRESENTA:

BALTIERRA JASSO LAURA ESTHER

Asesor externo: Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Asesor interno: Dr. Gustavo Valencia del Toro

Evalúador: M. en C. Rodrigo Balam Muñoz Soto

México, D.F., 19 de Mayo de 2008.

Agradecimientos

Son tantas las personas que me han alentado y apoyado, que es difícil hacer una lista de ellas, no quisiera olvidar a nadie, ya que valoro cada consejo y enseñanza que me han brindado.

Ustedes han forjado en mí sentimientos que llevaré por siempre en mi corazón, cada uno representa una parte importante de mi vida, y aunque las distancias y adversidades nos han separado aún así han estado conmigo todo este tiempo, mil gracias.

Me gustaría nombrar algunas de éstas personas, agradeciéndoles la dicha que me han dado por formar parte de mi vida. A mis papás Inés y Lauro por su paciencia, cariño y apoyo en cada etapa, a mi hermano Gabriel por ser mi inspiración y mi mayor compañía; a mis amigos Laura, Adrian, Adriana, Alicia, Beatriz, Miguel, Ceci, Nadinne, Rebeca...por enseñarme que un amigo es aquel que te acompaña incluso en los momentos más difíciles. A mi familia, por alentarme a terminar todos mis proyectos.....

*A mis compañeros de los laboratorios 8 y 9 de virología, en especial a Carlos, su apoyo, amistad y enseñanza hicieron posible éste proyecto. Por su puesto quisiera agradecerle a la Dra. Ana Lorena por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto...
....muchas gracias.*

Aún quedan tantos por nombrar, pero cada uno de ellos saben lo mucho que les aprecio.

Quisiera dedicar este trabajo en memoria de mis abuelos, ustedes me enseñaron la lección más importante...el amor incondicional que la familia te puede dar.....

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	3
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
<i>Replicación viral</i>	9
<i>Traducción viral</i>	9
<i>Replicación vira</i>	10
<i>hnRNP's</i>	11
ANTECEDENTES	12
<i>Papel de la hnRNP A1 en la replicación viral</i>	12
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVOS	14
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	14

METODOLOGÍA	15
RESULTADOS	25
<i>Ensayo in silico para la amplificación de la secuencia que codifica para la hnRNP A1</i>	26
<i>Ligación del inserto en el vector de expresión pProEx Hta</i>	28
<i>Expresión y Purificación de la proteína hnRNP A1 recombinante</i>	30
<i>Identificación de la proteína recombinante hnRNP A1</i>	32
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
CONCLUSIONES	36
PERSPECTIVAS	37
REFERENCIAS	37
ANEXO	40

ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS Y TABLAS

Figura 1. Cápside del virus Norwalk	8
Figura 2. Representación esquemática del genoma del virus Norwalk	10
Figura 3. Procesamiento del RNA en células eucariontes	12
Figura 4. Amplificación de la secuencia de la hnRNP A1 y Clonación en el vector PJET1/bluntA1	27
Figura 5. Restricción del vector PJET1/blunt-A1 con las enzimas EcoRI y XhoI	28
Figura 6. Purificación por electroelución del inserto hnRNP A1.	28
Figura 7. Ligación del fragmento hnRNP A1 al vector de expresión pProEx Hta.	29
Figura 8. Amplificación del gen del hnRNP A1 por PCR colony de las bacterias transformadas con la reacción de ligación pProEx Hta-A1	30
Figura 9. Inducción de la proteína hnRNP A1	31
Figura 10. Elusión de la hnRNP A1 de las perlas de Níquel-NTA	32
Figura 11. Identificación de la hnRNP A1 con anticuerpos específicos por Western Blot	33
Figura 12. Mapa del vector pJet1/blunt.	40
Figura 13. Mapa del vector pProEx Hta.	40

Cuadro 1. Programa de PCR para la amplificación del gen de la hnRNP A1 a partir de cDNA de células HeLa.	17
Cuadro 2. Programa de PCR-colony para la amplificación del gen de la hnRNP A1 a partir de las bacterias transformadas.	19
Tabla 1. Tabla de abreviaturas	41
Tabla 2. Nomenclatura	43

RESUMEN.

Los virus son parásitos intracelulares estrictos debido a su incapacidad de codificar los componentes necesarios para su replicación. Específicamente los virus de ácido ribonucleico (RNA) de cadena sencilla y polaridad positiva poseen la información para sintetizar a sus propias proteínas a partir de su genoma, ya que funciona como un RNA mensajero (RNAm). Posteriormente el RNA debe copiarse a una cadena complementaria o negativa que a su vez funcione como molde para la síntesis de RNAs positivos (+) que constituyen el genoma de la progenie viral. Las estrategias que los virus han desarrollado desde la entrada a la célula hasta la salida de los múltiples viriones, dependen de su interrelación constante con factores celulares. La disección de cada uno de los pasos del ciclo replicativo de estos virus ha puesto de manifiesto la participación de un gran número de proteínas celulares esenciales para ello. Particularmente, las proteínas con dominios de unión al RNA participan en la regulación de la traducción y de la replicación del genoma, como la Ribonucleoproteína heterogéneo nuclear A1 (hnRNP A1) la cual interviene en el procesamiento de los RNAm celulares; sin embargo ésta es capaz de interactuar con algunos RNA virales y participar en hacer más eficiente la traducción y la replicación del genoma de virus de RNA de polaridad positiva. Dado que los *Norovirus*, agentes importantes en la generación de gastroenteritis a nivel mundial, pertenecen a este tipo de virus, el presente trabajo se enfoca en obtener a la hnRNP A1 para, posteriormente, determinar su posible participación en el ciclo replicativo de los *Norovirus*; lo que facilitará el desarrollo de estrategias para su control y prevención. Para lo cual se amplificó el gen que codifica a la hnRNP A1, mediante una reacción de PCR, a partir de cDNA de células HeLa, usando oligonucleótidos específicos. Este gen de 963 pb se ligó al vector de clonación PJET1/blunt y se recuperó el inserto por restricción enzimática; el gen purificado se ligó con el vector de expresión pProEx Hta y se transformaron bacterias. La presencia del gen se comprobó por la amplificación una banda de 963 pb empleando la técnica de PCR colony. Una de las colonias positivas se empleó para la expresión de la proteína, se probaron varias condiciones

de inducción resultando las de: DO = 0.6, IPTG = 0.7 mM, incubando 3 h a 37 °C, las que brindaron mayor producción de proteína, la cual se purificó empleando perlas de Ni-NTA. Para comprobar que la proteína purificada era realmente la hnRNP A1, se realizó un ensayo de Western Blot utilizando anticuerpos comerciales específicos para la hnRNP A1. Estos anticuerpos fueron capaces de reconocer una banda de aproximadamente 37 kDa en las bacterias inducidas y en la proteína purificada, no así en las bacterias no inducidas, lo cual corroboró la identidad de la proteína.

INTRODUCCIÓN.

Las gastroenteritis virales son enfermedades del sistema digestivo con una alta tasa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Recientemente se han identificado cuatro grupos de virus causantes de gastroenteritis en humanos: *Adenovirus*, *Astrovirus*, *Rotavirus* y *Calicivirus*.

Los *Calicivirus* pertenecen a la familia *Caliciviridae* la cual está constituida por cuatro géneros: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus* y *Sapovirus*; éstos son virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, con un genoma de aproximadamente 7.5 kb que esta poliadenilado en el extremo 3' terminal⁽¹²⁾, y son causantes de enfermedades tanto en humanos como en animales. Los únicos *Calicivirus* asociados a gastroenteritis humanas corresponden al género *Norovirus* y *Sapovirus*, los cuales son responsables de la mayoría de los brotes de gastroenteritis no bacteriana, a nivel mundial⁽¹¹⁾, causadas por el consumo de alimentos y agua contaminada, por el contacto entre personas y con superficies contaminadas. Ambos géneros se han agrupado como *Calicivirus* humanos (HuCVs).

El prototipo de los HuCVs es el virus Norwalk (NV), el cual fue el primer virus en haber sido descubierto como agente causante de gastroenteritis durante un brote de esta enfermedad en una escuela en Norwalk, Ohio, en 1972⁽²⁾. Desde entonces, muchos otros virus similares a NV se han conocido. Los brotes de HuCVs involucran personas de todas las edades en comunidades cerradas como lo son cruceros, aviones, enfermerías, hospitales, escuelas, hoteles y restaurantes⁽⁷⁾. Son clasificados como agentes biológicos de clase B por su alto índice de infección, estabilidad, repentinos brotes y debilitamiento por la enfermedad. Los *Norovirus* causan síntomas como dolor estomacal, diarrea, vómito y fiebre de bajo grado y generalmente se autolimita; sin embargo causan un considerable índice de morbilidad y representan un impacto económico significativo en la población en general. Solamente en Estados Unidos de

Norteamérica se presentan anualmente 23 millones de casos y 50, 000 hospitalizaciones. Más aun, no existe un sistema de control, fármaco o vacuna como tratamiento o prevención. Las partículas virales resisten temperaturas bajas de congelamiento y altas hasta de 60 °C, además de las concentraciones de cloro¹ que son añadidas al agua potable. Adicionalmente, los HuCVS no pueden propagarse en cultivo, por lo que muchos aspectos de su biología aún se desconocen.

Una alternativa para su estudio ha sido el análisis molecular de las proteínas virales que participan en el ciclo replicativo o el uso de modelos animales como el *Norovirus murino*, que si puede propagarse en cultivo celular y que representa un muy buen modelo del estudio de su biología molecular y patogénesis.

NV es un virus redondo de apariencia amorfa con un borde irregular saliente, con un diámetro de 27 nm que carece de envoltura (ver Figura 1). Contiene un genoma de RNA de 7.7 kb que en el extremo 5' terminal carece de la estructura Cap, que es característica de los RNA mensajeros eucarióticos, y en su lugar tiene unida covalentemente a la proteína viral Vpg⁽⁶⁾. Por otro lado, en el extremo 3' esta poliadenilado.

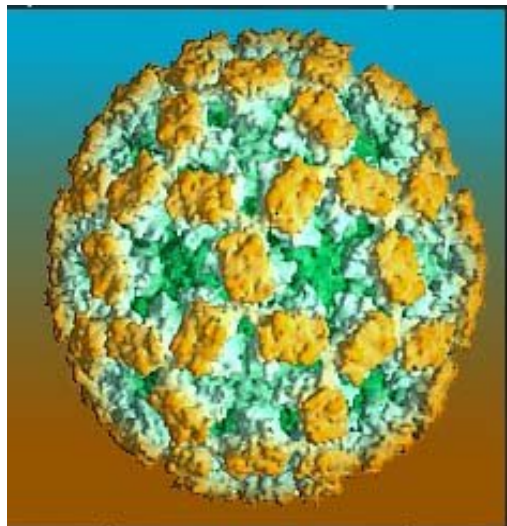


Figura 1. Cápside del Virus Norwalk.

¹ Según la EPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos) el nivel máximo de cloro en el agua potable es de 1 mg/L.

Replicación Viral.

Traducción viral.

El primer paso en la replicación de un virus es su interacción con la superficie celular; NV se une a través de los antígenos de superficie del grupo sanguíneo ABH, lo que conlleva a la entrada del genoma a la célula. Debido a que el genoma de NV es un RNA (+) de cadena sencilla, una vez que se localiza en el citoplasma celular puede actuar como RNA mensajero y sintetizar proteínas virales utilizando la maquinaria traduccional celular. El mecanismo por el cual NV inicia su traducción es poco conocido; no obstante, algunos experimentos proponen que el reclutamiento del ribosoma podría ocurrir a través de un mecanismo en el que la subunidad ribosomal 40S interactúa con la proteína Vpg⁽¹⁶⁾.

Cualquiera que sea el mecanismo, la traducción del RNA genómico da origen a las proteínas no estructurales y a las estructurales. Estas se encuentran codificadas por tres marcos de lectura abiertos (ORF). El primero de ellos da origen a una poliproteína de aproximadamente 190 kDa, que es capaz de autoprocesarse y dar origen a varias proteínas no estructurales virales: p48, se piensa que tiene una función de proteína de plataforma en el ensamble del complejo de replicación; NTPasa (p41, p40 o 2C) es clasificada como una RNA helicasa además de tener actividad como una nucleósido trifostafasa; 3A (p22 o p20) con una función hasta ahora desconocida; Vpg que está unida covalentemente al RNA genómico y subgenómico, 3C (3CL^{pro}) que es la única proteasa codificada por los Calicivirus ; y la 3D (RdRp) que es la RNA polimerasa o replicasa viral⁽⁸⁾; todas ellas sintetizadas a partir del RNA genómico.

Asimismo, los marcos de lectura dos y tres dan origen a las proteínas mayoritaria (VP1) y minoritaria (VP2) de la cápside a partir de un RNA subgenómico de aproximadamente 2.3 kb⁽⁷⁾ (ver Figura 2).

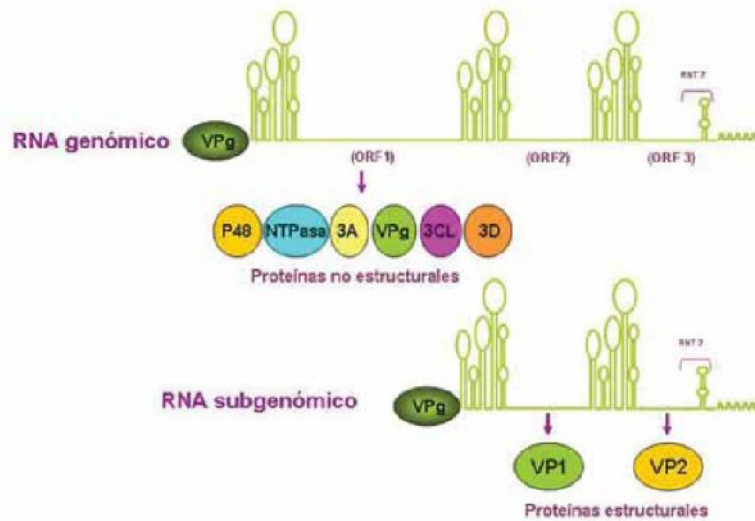


Figura 2. Representación esquemática del genoma del virus Norwalk.

El genoma de NV posee tres marcos de lectura abiertos (ORF). El primero codifica para las proteínas no estructurales y los otros dos a las proteínas de la cápside a partir de un RNA subgenómico. RNT: Región no traducida⁽⁷⁾.

Replicación del RNA.

Una vez que se produce una cierta cantidad de proteína viral, este RNA de polaridad positiva (+) deja de traducirse para servir como molde para copiar su RNA en moléculas de RNA de polaridad negativa (-) que a su vez sirven como molde para producir más RNA (+) que puede traducirse, replicarse; pero que principalmente forma el genoma de la progenie viral. La polimerasa es la encargada de la síntesis de las moléculas de RNA (+) y RNA (-), la cual se une al extremo 3' terminal de los RNAs que serán copiados. Este complejo replicativo requiere de la participación de otras proteínas virales y de proteínas celulares con diversas funciones como el relajamiento de la molécula de RNA, el copiado correcto del RNA, entre otras. Muchas de estas

proteínas se caracterizan por tener dominios de unión al RNA, y participan en diversas funciones relacionadas con la síntesis, procesamiento, maduración y transporte de los RNAs celulares.

Por ejemplo, durante la síntesis de RNA mensajero en los eucariontes, el pre-RNA_m se une no sólo a factores de procesamiento, sino también a ribonucleoproteínas heterogéneas (hnRNPs), las cuales se piensa que inducen el procesamiento y plegado correcto del pre-RNA_m. Algunas de ellas permanecen unidas después de que se concluye la edición de RNA, e incluso permanecen unidas durante su transporte al citoplasma y posteriormente regresan al núcleo.

hnRNP's.

Las hnRNPs son una familia de proteínas, de más de 20 miembros identificados en células humanas, las cuales realizan diferentes funciones además de la regulación del proceso de procesamiento del RNA⁽¹⁾.

Una de estas hnRNPs es la hnRNP A1 la cual es una proteína núcleo-citoplásmica de 34k Da; de las más abundantes en células de mamíferos. En su estructura, contiene dos dominios de unión con el RNA (RBDs del inglés: RNA binding domains) en el extremo amino N-terminal y un dominio rico en glicina en el carboxilo terminal para la interacción proteína-proteína⁽¹⁵⁾. La proteína A1 se une al pre-RNA_m y juega un papel importante, en el proceso de maduración del RNA mensajeros eucarióticos, teniendo como sitio específico de unión la secuencia: UAGGGA/U (ver Figura 3).

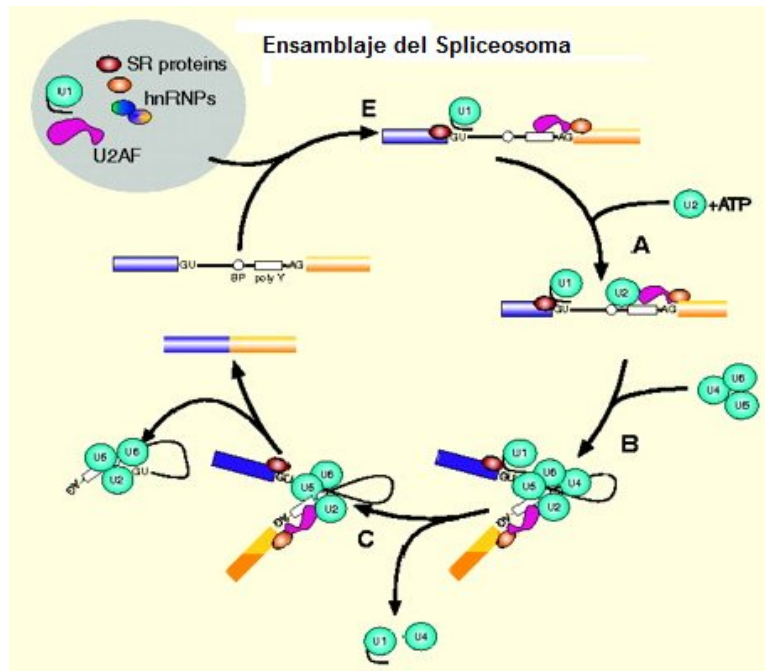


Figura 3. Procesamiento del RNA en células eucariontes.

Eliminación de intrones en el RNA para obtener RNAm maduro.

ANTECEDENTES.

Papel de la hnRNP A1 en la replicación viral.

Durante la replicación del RNA genómico de algunos virus, se ha descrito la participación de proteínas celulares, muchas de las cuales tienen secuencias de unión al RNA. Particularmente la proteína hnRNP A1 tiene la capacidad para unirse a moléculas de RNA; lo que seguramente le ha permitido unirse a genomas virales.

En 1997, Li Hsin-Pai y colaboradores identificaron que la proteína hnRNP A1 se une de manera específica a la secuencia del RNA viral del virus de la hepatitis de ratón (MHV). Durante la infección con MHV, hnRNP A1 se re-localiza desde el núcleo al citoplasma, donde ocurre la replicación viral, sugiriendo que es un factor celular que regula la transcripción de virus de RNA⁽¹²⁾. Este descubrimiento condujo al equipo de

Shi Stephanie a que en el 2000 demostraran que hnRNP A1 participa en la transcripción y replicación de virus de RNA citoplásmicos⁽¹⁵⁾.

Posteriormente en el 2002, Zhang Xuming y colaboradores verificaron que hnRNP A1 puede mediar la formación del complejo de RNP con el RNA del MHV, ya que la depleción de la proteína hnRNP A1 de la reacción evita la formación de dicho complejo⁽¹⁹⁾. El planteamiento de la participación de hnRNP A1 en la replicación del MHV produjo estudios de la participación de ésta en otros modelos virales; como en el procesamiento del RNA del *Papillomavirus humano* tipo 16, durante la expresión de su cápside viral⁽²⁰⁾.

En un estudio más reciente, Harris Dylan y colaboradores (2006), demostraron a partir de un sistema de unión por afinidad al RNA, la posible participación de más de 70 proteínas celulares que interactúan con la región 3' no traducida (RNT) del genoma del virus de la hepatitis C (HCV). Una de las proteínas hnRNPs más estudiadas fue la hnRNP A1, la cual contiene regiones de reconocimiento de RNA y está implicada en algunas funciones, incluyendo su papel en el procesamiento alternativo de transcritos de RNA.

JUSTIFICACIÓN.

Los virus son tan austeros que están obligados a ser parásitos intracelulares estrictos ya que dependen de la maquinaria celular para poder completar su ciclo replicativo. Es por ello que la interacción entre el genoma viral y diversas moléculas celulares es esencial para llevar a cabo el ciclo replicativo viral. La identificación de proteínas celulares que participan en la regulación de la replicación del virus ha permitido entender su biología y utilizarlas como blanco terapéutico o de control de la infección.

Los HuCVs son responsables de la generación de diarrea en toda la población humana, siendo esta grave en la población infantil y en los adultos mayores, y hasta la fecha no se conoce fármaco o vacuna para su control. El entender su biología e identificar moléculas importantes para su replicación podrían ser utilizadas para el control de la enfermedad. Dado que los HuCVs no pueden propagarse en cultivo celular, el uso de proteínas recombinantes permite la obtención, de manera sencilla, de una gran cantidad de proteínas específicas cuyas funciones en la replicación viral puede ser evaluada mediante diversas estrategias, como su interacción específica con el genoma, o para la creación de anticuerpos que puedan bloquear la función de la misma y con ello controlar la infección.

OBJETIVOS.

Obtención de la Ribonucleoproteína heterogénea Nuclear A1 (hnRNP A1) humana recombinante.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Clonación de la secuencia que codifica a la proteína recombinante hnRNP A1.
- Expresar y purificar a la proteína recombinante hnRNP A1.
- Identificarla mediante ensayos tipo Western Blot.

METODOLOGÍA.

Preparación de Células E. coli DH5α Competentes por el Método de Cloruro de Calcio.

Se creció una asada de bacterias de la cepa *E. coli* DH5α, en 5 mL de medio Luria, toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se inoculó 1 mL del cultivo anterior en 100 mL de medio Luria, se incubó a 37 °C con agitación hasta que la densidad óptica llegó a 0.48. Se colocaron las bacterias 15 minutos en hielo, para posteriormente centrifugar 15 minutos a 14000 rpm; el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 0.4 del volumen original de buffer TfbI (Acetato de potasio 30 mM, Cloruro de Potasio 100 mM, Cloruro de Calcio 10 mM, Cloruro de Manganeso 50 mM, Glicerol 15% v/v; a pH 5.8), incubando 15 minutos en hielo. Se centrifugó 15 minutos a 14000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 0.04 del volumen original de buffer TfbII (MOPS 10 mM, Cloruro de Calcio 75 mM, Cloruro de Potasio 10 mM, glicerol 15% v/v; a pH 6.5), por 15 minutos (en hielo). Se almacenaron las células a -70 °C hasta utilizarlas.

Amplificación del Gen que codifica para la hnRNP A1 por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Diseñamos los oligonucleótidos para amplificar la secuencia del gen de la hnRNP A1 a partir del cDNA de células HeLa². Con éstos oligonucleótidos se realizó un ensayo *in silico* empleando los programas Translate tool³ y Reverse Translate⁴ para verificar que la secuencia que amplifican codifica para la proteína hnRNP A1. A éstos oligonucleótidos se les agregan los sitios de corte para las enzimas de restricción

² La secuencia se encuentra en la base de datos del Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

³ Programa que genera codones de la secuencia amplificada. www.expasy.org/tools.

⁴ Programa que traslada la secuencia de la proteína a la secuencia de aminoácidos. www.expasy.org/tools.

seleccionadas (EcoRI y XhoI), con base en el sitio de multiclonación del vector de expresión pProEx Hta⁵, para poder clonar la secuencia en el sentido adecuado:

Oligonucleótido en sentido 5' a 3':

GCCGGAATTCATGTCTAAGTCAGAGTCTCCTAAAG

*Sitio de corte de la enzima EcoRI

Oligonucleótido en antisentido 5' a 3':

GCCCGCTCGAGTTAAAATCTTCTGCCACTGCCATAG

*Sitio de corte de la enzima XhoI

Una vez sintetizados los oligonucleótidos, se realizó la mezcla de reacción para PCR según las especificaciones del proveedor (Roche): 2,5 µL de buffer de reacción con MgCl₂ 10x, 0.3 µL de DNA Taq polimerasa 5 U/µL, 0.5 µL de cada oligonucleótido diseñado, 0.5 µL de DNA⁶, 1 µL de la mezcla dNTP's (10 mM cada uno) y 19.7 µL de agua para PCR. Colocamos la mezcla en el termociclador e ingresamos las especificaciones del programa de PCR (ver Cuadro 1) con base en la temperatura teórica de alineamiento de los primers diseñados:

$$T_{\text{alineamiento}} = 4(\text{GC}) + 2(\text{AT})$$

⁵ Ver mapa del vector pProEx Hta en el anexo: Figura 13.

⁶ Para la reacción se utilizó cDNA de células Hela.

Cuadro 1. Programa de PCR para la amplificación del gen de la hnRNP A1
a partir de cDNA de células HeLa.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94°C	30 segundos
Alineamiento	65°C	30 segundos
Alargamiento	68°C	1 minuto
Alargamiento	68°C	7 minutos
	4°C	∞

} 35 ciclos

Terminada la PCR, analizamos una alícuota del producto de PCR por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y guardamos el producto restante a 4°C.

Preparación de Gel de Agarosa.

Una cantidad de agarosa para una concentración final de 1.5%, se disuelve en 30 mL de TBE 1x (10x = 108 g de Tris base, 55 g de Ácido bórico y 9.3 g de EDTA) calentando en microondas hasta que la agarosa se disuelva totalmente. Se agrega 1 µL de bromuro de etidio, se mezcla y vierte la solución sobre el carro de la cámara, y se deja gelificar. Una vez gelificado, se retiran los carriles y colocamos el carro en la cámara de electroforesis, agregando TBE 0.5x hasta cubrir el gel. A cada muestra se le añade 1/10 de volumen de buffer de carga. Los marcadores de peso molecular (MTM) se emplearán como referencia para determinar el tamaño del fragmento amplificado. Las muestras se sometieron a electroforesis a 120 V el tiempo necesario para la separación de la banda amplificada (aproximadamente 50 minutos). Finalmente se observa el gel en el transiluminador.

Ligación en el vector de clonación PJET1/blunt⁷.

Mezcla de reacción: 10 µL de buffer de reacción 2x, 2 µL del producto de PCR, 5 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de la enzima DNA blunting. Mezclamos en vortex y centrifugamos por 3 a 5 segundos; incubamos la mezcla a 70 °C por 5 minutos, pasando inmediatamente a hielo por algunos segundos. Añadimos al tubo con la mezcla de reacción: 1 µL del Vector de clonación PJET1/blunt (50 ng/µL) y 1 µL de DNA ligasa T4 (5 u/µL), mezclando en vortex y centrifugando por 3 a 5 segundos. Incubamos la mezcla a temperatura ambiente por 30 minutos⁸. Esta mezcla de ligación se utiliza directamente para transformar células competentes.

Transformación de bacterias.

Se descongelan en hielo células competentes y se les agregan 2 µL del vector que se requiere propagar (reacción de clonación), incubando en hielo por 30 minutos. Se le da un choque térmico a las células, a 42 °C por 90 segundos e inmediatamente se incuban en hielo durante 2 minutos. Se añaden 250 µL de medio Luria sin antibiótico, y la mezcla se incuba 1 hora a 37 °C; posteriormente se siembran las bacterias en cajas Petri que contienen medio Luria con ampicilina (10 µL de ampicilina⁹ /mL de medio) y se dejan crecer toda la noche a 37 °C.

⁷ Gene Jet PCR Cloning Kit (Fermentas): Ligación con el vector de clonación PJET1/blunt. Ver mapa del vector en el anexo: Figura 12.

⁸ Se extiende el tiempo de incubación, de acuerdo al manual, para obtener el número de transformantes máximo.

⁹ La ampicilina se utiliza a una concentración de 50 mg/mL.

PCR colony para la selección de colonias que contienen el plásmido con el inserto hnRNP A1.

Una asada de la colonia a analizar se disolvió en una mezcla que contiene: 8.45 µL de Agua para PCR, 1 µL de buffer de reacción con MgCl₂ 10x, 0.25 µL de Dinucleótidos trifosfatados (dNTP's) (10 mM cada uno), 0.125 µL de Oligonucleótidos y 0.05 µL de DNA Taq polimerasa 5 U/µL. Establecimos el programa de PCR (ver Cuadro 2).

Cuadro 2. Programa de PCR-colony para la amplificación del gen de la hnRNP A1 a partir de las bacterias transformadas.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	94°C	10 minutos
Desnaturalización	94°C	30 segundos
Alineamiento	60°C	30 segundos
Alargamiento	72°C	1 minuto
Alargamiento	72°C	7 minutos
	4°C	∞

} 25 ciclos

Posteriormente, analizamos el producto de amplificación en un gel de agarosa al 1.5 %.

Purificación de plásmido por Lisis Alcalina.

Bacterias que contienen el plásmido de interés se crecieron toda la noche a 37 °C en 5 mL de medio Luria con antibiótico, pasando ese tiempo se centrifugaron a 12000 rpm durante 30 segundos. Se removió el sobrenadante, y se resuspendió el botón en 100 µL de la solución I (Glucosa 50 mM, Tris-HCl pH 8 25 mM, EDTA a pH 8 10 mM), agitando en vortex. Se agregaron 200 µL de la solución II (20 µL de NaOH 10 N, SDS 10% p/v y 880 µL de agua destilada), invirtiendo varias veces el tubo y colocando en hielo. Se agregaron 150 µL de la solución III (Acetato de potasio 5 M, 11.5 mL de Ácido acético glacial y 28.5 mL de agua destilada) a cada tubo, invirtiendo

varias veces. Se incubó 5 minutos en hielo y se centrifugó a 12000 rpm por 6 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio para agregar un volumen de la mezcla de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 12000 rpm por 6 minutos a 4 °C, recuperando la fase superior en un tubo limpio; se agregaron 2 volúmenes de etanol frío al 100%, invirtiendo varias veces y dejando 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó el tubo a 12000 rpm por 6 minutos a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Finalmente se resuspendió la pastilla en 50 µL de agua miliQ y agregamos 1 µL de RNAsa A (10 U/mL), incubando 15 minutos a 37 °C. Se guardó el vial a -20 °C.

Reacción de restricción enzimática para liberar el inserto hnRNP A1 del plásmido PJET1/bluntA1.

Para la reacción de restricción enzimática se colocaron 2 µL del plásmido que contiene el inserto de la hnRNP A1, 0.5 µL de enzima EcoRI 10 U/µL y 0.5 µL de enzima XhoI 10 U/µL en un horno de microondas a temperatura máxima durante 20 segundos y se dejó reposar 40 segundos a temperatura ambiente, se repitió cuatro veces y se corroboró el corte por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.

Una vez corroborada la presencia del inserto, se procedió a hacer una reacción de restricción convencional, para obtener una cantidad suficiente del gen hnRNP A1 y clonarla en el vector de expresión pProEx Hta. Inicialmente se mezclaron: 14 µL del plásmido, 4 µL de enzima EcoRI 10 U/µL, 4 µL de enzima XhoI 10 U/µL, 40 µL de Buffer 10x de la enzima XhoI, 4 µL de BSA¹⁰ 10 mg/mL y 334 µL de agua destilada; se incubó toda la noche a 37 °C. Posteriormente la eficiencia de corte se determinó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %.

Purificación de Inserto por Electroelusión.

¹⁰ Albúmina.

El gen de la hnRNP A1 se separó por electroforesis en geles de agarosa y la banda correspondiente se recorta de los geles de agarosa en un transiluminador. Por otro lado se coloca en la cámara de electroelución TBE 0.5x. Colocamos en los pozos delgados acetato de amonio 10 M y en los demás pozos de la cámara se colocaron las bandas del gel de agarosa y se deja correr 1 hora a 130 V. Todo el acetato de amonio se recuperó en un tubo con capacidad de 1.5 mL y el DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol frío; incubando el tubo a -70 °C por 1 hora. Posteriormente se centrifuga a 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C, y se decanta. La pastilla se seca al aire y se resuspende en 30 µL de agua miliQ.

Restricción del Vector de Expresión pProEx Hta con las enzimas EcoRI y XhoI.

Dos microgramos de plásmido¹¹, se mezclan con: 10 µL de buffer 10x de la enzima XhoI, 2.5 µL de enzima EcoRI 10 U/µL, 2.5 µL de enzima XhoI 10 U/µL y 68.7 µL de agua grado PCR. Se incuba toda la noche a 37 °C y al día siguiente se verifica el corte del plásmido en un gel de agarosa al 1.5%. El plásmido sin cortar así como los marcadores de peso molecular, se utilizan como referencia.

Ligación del inserto (hnRNP A1) en el vector de expresión pProEx Hta.

Para clonar el inserto hnRNP A1 en el vector pProEx Hta, inicialmente se mezclaron: 1 µL del Vector pProEx Hta y 1.5µL de Inserto (hnRNP A1) en un volumen final de 6.1 µL (empleando agua miliQ). Se coloca la mezcla a 68 °C por 3 minutos e inmediatamente se coloca en hielo. La reacción de ligación se prepara adicionando: 1 µL de buffer de ligasa 10x, 0.5 µL de ATP 10 mM, 0.1 µL de BSA 10 mg/mL y 0.3 µL de DNA T4 ligasa (1 unidad/µL), esta solución se mezcla con el DNA y se coloca en

¹¹ Vector pProEx Hta.

hielo por 1 hora. Posteriormente se transformaron bacterias competentes con 2 μ L de la mezcla de ligación.

Inducción de la expresión de la proteína hnRNP A1 en bacterias E. coli DH5 α .

Debido a que en la literatura no se encontraron condiciones de inducción de la hnRNP A1, se realizaron diferentes pruebas de inducción modificando densidad óptica, temperatura, concentración de IPTG y tiempo. Se sembró una asada de las bacterias que contienen el inserto de interés en tubos de ensaye que contienen 5 mL de medio Luria con ampicilina y se dejaron crecer toda la noche a 37 °C. Transcurrido ese tiempo se ajustó la densidad óptica (DO), trabajando en un intervalo de 0.5 a 0.7 DO. Se agregó el IPTG (IPTG 100 mM) a concentraciones de 0.5 mM, 0.6 mM, 0.7 mM y 1 mM. Se incubaron las bacterias 3 h a 37 °C o toda la noche a temperatura ambiente. Para verificar la expresión de la proteína hnRNP A1, 400 μ L del cultivo bacteriano se centrifugaron a 12000 rpm por 2 minutos y la pastilla se resuspendió en vortex. Se agregó la mitad del volumen de buffer de carga (buffer de Laemli 2x) y se hirvieron los tubos durante 10 minutos.

La muestra se analizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% durante 1 hora a 120 V. Posteriormente se tiñó el gel con solución de Coomassie durante 15 minutos (Azul de Coomassie R250 0.2% v/v, Metanol 50% v/v, Ácido acético 7% v/v) y se destiñó adicionando solución de desteñido (Metanol 30% v/v, Ácido acético 7% v/v). Se observó la expresión de la hnRNP A1 en las diferentes pruebas de inducción, siendo la mayor inducción en las condiciones de: DO de 0.6, concentración de IPTG de 0.7 mM, e incubación de 3 h a 37 °C. Estas últimas condiciones se emplean para realizar una inducción con un cultivo de 250 mL de medio.

Metodología para la preparación de geles de poliacrilamida-SDS para proteínas.

Se prepara la solución separadora en un vaso de precipitados con las proporciones requeridas para un gel al 12% de poliacrilamida; se añaden: 4 mL de solución A (30 g de Acrilamida, 0.8 g de Bis acrilamida; aforar a 100 mL con agua destilada), 2.5 mL de solución B (12.11 g de Tris base a pH 8.8; aforar a 100 mL con agua), 100 µL de solución C (SDS 10% p/v), 3 mL de agua destilada, 40 µL de persulfato de amonio (al 10% p/v) y 16.6 µL de TEMED; mezclando vigorosamente. Colocamos la mezcla en las placas de vidrio puestas en posición vertical, añadiendo 2 mL de etanol para aplanar el gel y eliminar burbujas. Mientras gelifica, preparamos la solución del gel concentrador: 665 µL de solución A, 625 µL de solución D (12.11 g de Tris base a pH 6.8; aforar a 100 mL), 50 µL de solución C, 3.6 mL de agua, 100 µL de persulfato de amonio y 5 µL de TEMED. Una vez gelificado el gel separador, retiramos el etanol y vertemos la mezcla del gel concentrador con cuidado de formar burbujas, colocamos el peine y dejamos solidificar. Quitamos el peine, se colocó el gel en la cámara de electroforesis con amortiguador de proteínas 1x (10x = 14.4% p/v de glicina, 3% p/v de tris base y 1% p/v de SDS).

Técnica de purificación de proteínas.

Se empastillaron las bacterias a 5000 rpm por 15 minutos a 4 °C, decantamos y la pastilla se resuspendió en 5 mL de buffer de lisis (6.9 g de NaH₂PO₄ H₂O, 233.76 g de NaCl y 0.68 g de imidazol, ajustando el pH a 8 utilizando NaOH) por cada gramo de bacteria. Se añadió 10 µL de lisozima 10 (µg/mL) por cada mililitro de buffer de lisis, dejando actuar 30 minutos en hielo, posteriormente se añadieron 4 µL de DNAsa por cada 10 mL (1 U/mL), incubando 10 minutos a 37 °C. Se colocó mezcla de bacterias a tubos con capacidad de 1.5 mL para centrifugar a 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C; recuperamos el sobrenadante en un tubo y se añadieron 1 mL de perlas de Ni-NTA por cada 10 mL, y se interacciona toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se lavaron las

perlas tres veces con 5 mL de buffer de lavado de columna (6.9 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 17.54 g de NaCl y 1.36 g de imidazol, ajustando el pH a 8 utilizando NaOH), para eliminar las sales, lavamos dos veces con 5 mL de PBS 1x (10x = 2.4 g de NaH_2PO_4 , 14.4 g de Na_2HPO_4 , 80 g de NaCl, 2 g de KCl). Se retiró el PBS sin dejar secar las perlas y se adicionó buffer de elusión (6.9 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 17.54 g de NaCl y 17 g de imidazol, ajustando el pH a 8 utilizando NaOH).

Western Blot.

Para determinar la identidad de la proteína purificada, las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa empleando una cámara de electrotransferencia semihúmeda de la siguiente manera: Se equilibró en Amortiguador de Transferencia (5.82 g de Tris base, 2.92 g de Glicina, 100 mL de Metanol) el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa y papeles filtro gruesos por 5 a 10 minutos. Posteriormente se colocaron en la cámara dos papeles filtro gruesos, encima la membrana cortada, el gel de poliacrilamida y otras dos hojas de papel filtro, asegurándose de eliminar las burbujas entre cada material. La transferencia del gel se llevó a cabo a 16 V por 45 minutos. Para determinar la eficiencia de la transferencia, la membrana se tiñe con rojo de Ponceau y se lava con agua destilada. Se señala en la membrana los marcadores de peso molecular. Una vez corroborada la transferencia de las proteínas a la membrana, ésta se bloqueó con leche al 5% en PBS 1x durante al menos 1 hora a 37 °C. Después la membrana se enjuaga con PBS 1x y se añade el anticuerpo primario anti-hnRNP A1 diluido 1:10000 en PBS tween al 0.5% y se incuba toda la noche a 4 °C. Transcurrido ese tiempo, se realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS tween al 0.5% y se coloca el anticuerpo secundario anti-ratón peroxidasa diluido 1:15000 (o anti-ratón fosfatasa diluido 1:10000) en PBS tween al 0.5% durante 1 hora a 37 °C, finalmente se realizan 3 lavados adicionales de 5 minutos cada uno con PBS tween al 0.5% y se enjuaga rápidamente con PBS 1x. Las membranas se revelaron con el kit

SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate¹² (o con el kit Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase¹³), según las especificaciones del fabricante.

RESULTADOS.

Los virus tienen en general genomas muy austeros, por lo que para poder replicarse dependen de la maquinaria celular. Es por ello que establecen interacciones con las moléculas de origen celular. Particularmente los genomas virales interactúan con diversas proteínas celulares para su traducción y replicación. Por lo que los virus han desarrollado estrategias que hagan a éstas moléculas accesibles para ellos y con esto asegurar su supervivencia.

La falta de un sistema de cultivo *in vitro* del virus Norwalk ha obstaculizado el estudio de los mecanismos de replicación. Sin embargo, mediante diversos estudios de biología molecular y, la clonación y expresión de proteínas recombinantes, han permitido realizar avances importantes en el estudio de su ciclo replicativo. Con este tipo de ensayos en el laboratorio se han identificado a algunas proteínas que se unen al genoma del NV como lo son las proteínas La, PTB, PCBP, PABP y Nucleolina⁽⁷⁾, las cuales tienen papeles fundamentales en la replicación de otros virus de importancia en el humano. Así mismo, se ha determinado la interacción del genoma de NV con otras proteínas de diversos pesos moleculares que podrían, también, tener un papel funcional y que no han sido identificadas. Una de ellas, con un peso molecular de 34 kDa, interacciona con el genoma del NV. Este peso molecular coincide con el de la proteína hnRNP A1, la cual juega un papel esencial en la replicación de otros virus de RNA de polaridad positiva como el de la hepatitis C de humano.

¹² Fabricante: Thermo Scientific Pierce Protein Research Products.

¹³ Fabricante: Promega.

El presente trabajo se enfoca en la obtención de la proteína recombinante hnRNP A1, con la cual podremos determinar su posible interacción con el genoma de NV y posteriormente estudiar su participación en el ciclo replicativo de los virus de esta familia.

Es por ello que en este trabajo se clonó, purificó e identificó a la proteína hnRNP A1. Esta proteína recombinante representa una herramienta muy importante que será utilizada en el laboratorio para el estudio de la replicación de los *Calicivirus*.

Ensayo in silico para la amplificación de la secuencia que codifica para la hnRNP A1.

Con base en la secuencia reportada en la base de datos del Pubmed¹⁴ de la ribonucleoproteína heterogéneo nuclear A1 (hnRNP A1), se generaron los oligonucleótidos complementarios a los extremos de la misma y con ellos se logró mediante una reacción de PCR la amplificación del gen hnRNP A1 a partir del cDNA de células HeLa¹⁵, de un tamaño molecular de 963 pb como se esperaba (Figura 4 A, carril 2).

Este producto de PCR se ligó en el vector de clonación PJET 1/blunt (especial para clonar productos de PCR), con el fin de mejorar la eficiencia de corte, de las enzimas de restricción, a partir de un vector, que a partir de un producto de PCR. Para corroborar que la secuencia que corresponde al gen de la hnRNP A1 se logró clonar en el vector PJET1/blunt, se realizó una PCR colony de las clonas candidatas,

¹⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. *Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 transcript variant 2, mRNA*. Se utiliza esta variante por que representa la secuencia de la proteína completa.

¹⁵ Este compuesto fue donado por el Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda del Departamento de Biomedicina Molecular perteneciente al Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN.

obteniéndose en algunas de ellas un amplificado de aproximadamente 963 pb¹⁶ como se esperaba (Figura 4 B, carriles 3 a 5). A este plásmido se le llamó PJET1/bluntA1.

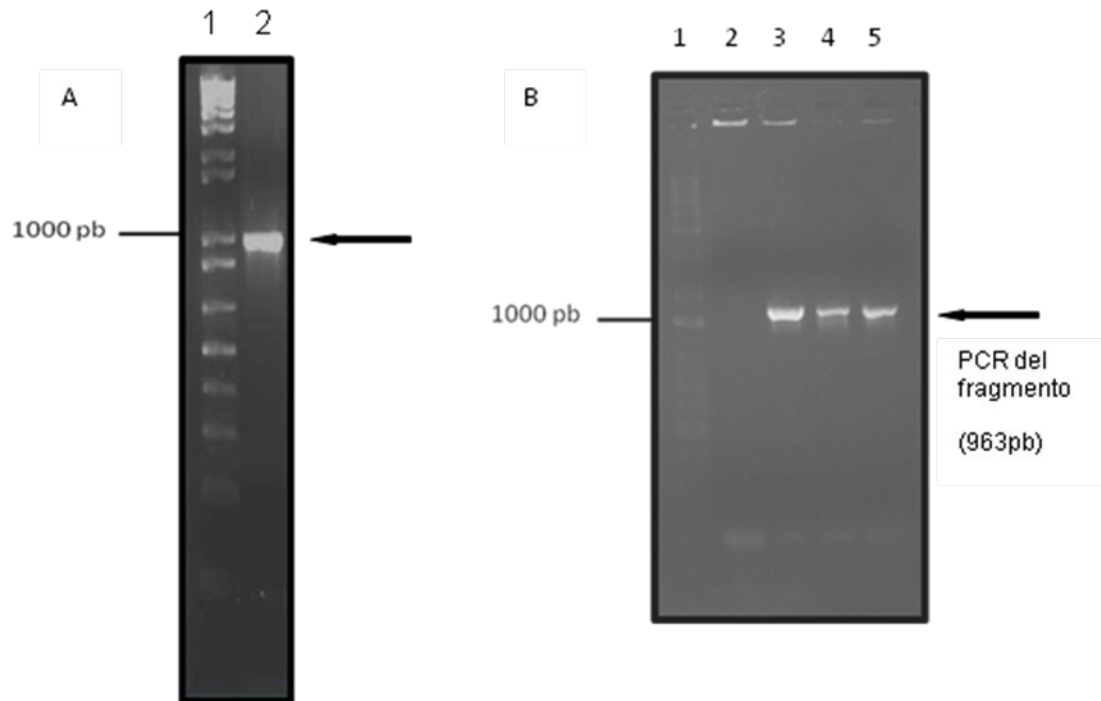


Figura 4. Amplificación de la secuencia de la hnRNP A1 y Clonación en el vector PJET1/bluntA1. A) El tamaño del producto de PCR del carril 2 corresponde al tamaño esperado de la secuencia de interés, el cual es de 963 pb. B) Amplificación por PCR colony del gen de la hnRNP A1 clonado en el plásmido PJET1/bluntA1. Las colonias que contienen el inserto se muestran en los carriles 3 a 5. Carril 1: MTM. El inserto amplificado se señala con una flecha del lado derecho de

A partir de las colonias positivas se purificó el plásmido (PJET1/bluntA1) por lisis alcalina para posteriormente liberar el inserto por restricción con las enzimas EcoRI y XhoI. (Figura 5, carril C). Una vez liberado el fragmento que contiene a la secuencia del gen de la proteína hnRNP A1 este se purificó por electroelusión y precipitación del DNA (Figura 6, carril 2).

¹⁶ La secuencia que codifica para la proteína hnRNP A1 contiene 963pb.

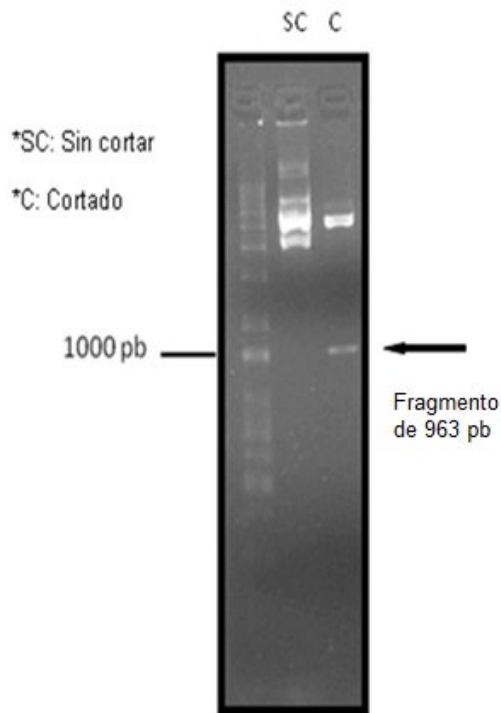


Figura 5. Restricción del vector PJET1/blunt-A1 con las enzimas EcoRI y XhoI, el tamaño del fragmento liberado corresponde al del gen hnRNP A1.

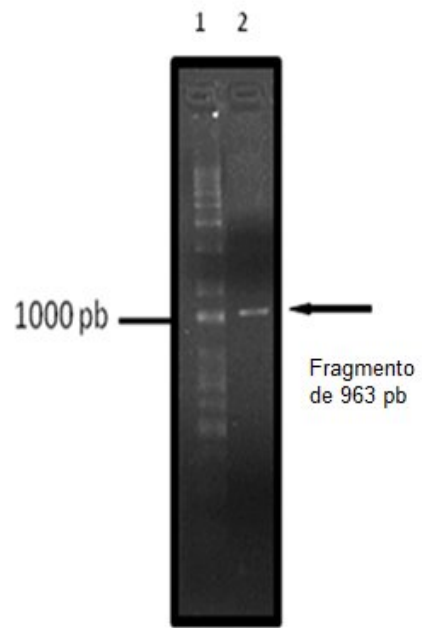


Figura 6. Purificación por electroelución del inserto hnRNP A1.

Ligación del inserto en el vector de expresión pProEx Hta.

Inicialmente, el vector de expresión pProEx Hta fue sometido a una restricción enzimática con las enzimas EcoRI y XhoI (Figura 7 A, carril 3) con el fin de linearizar al plásmido y generar extremos cohesivos. Este plásmido cortado se ligó con el gen purificado de la hnRNP A1 (Figura 6, carril 2) y con una reacción de ligación se transformaron bacterias (Figura 7 B).

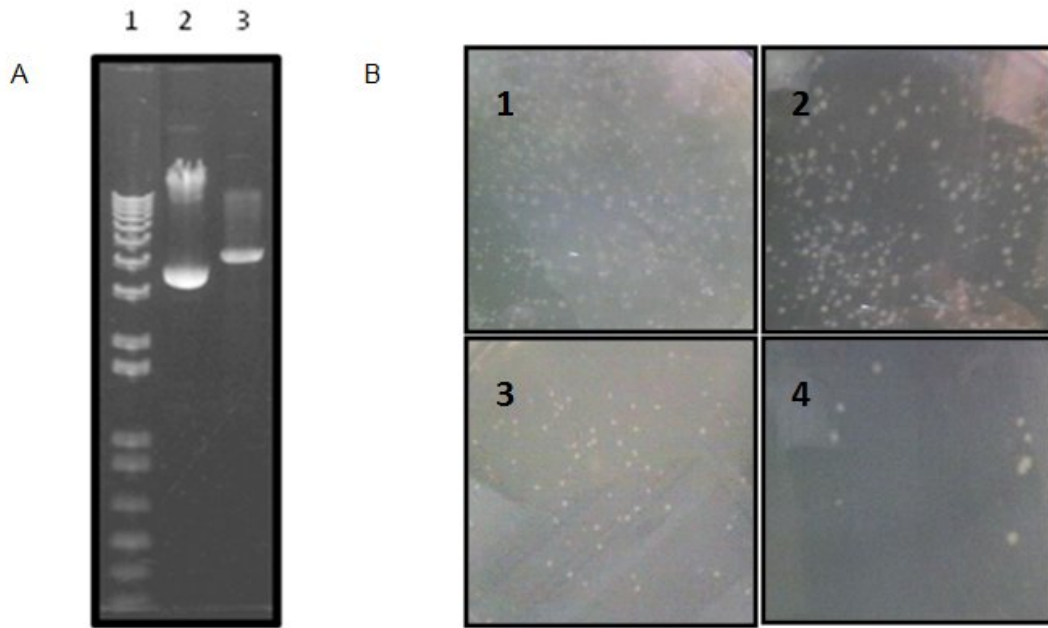


Figura 7. Ligación del fragmento hnRNP A1 al vector de expresión pProEx Hta. A) Restricción del vector pProEx Hta empleando las enzimas EcoRI y XhoI, en el carril 3. En el carril 2 se muestra el plásmido sin cortar. B) Bacterias transformadas con el plásmido pProEx Hta-A1, empleando diferentes concentraciones del inserto: 1) 1 μ L de vector + 1.5 μ L de inserto, 2) 1 μ L de vector + 2.5 μ L de inserto, 3) 1 μ L de vector + 3.5 μ L de inserto y 4) 1 μ L de vector + 5 μ L de inserto. * En la placa control no se observó crecimiento de bacterias.

La presencia del gen de la hnRNP A1 en el vector de expresión se corroboró por la amplificación, mediante PCR colony, de este gen con oligonucleótidos específicos (Figura 8, clonas 1 a 8, 10 a 12 y 14 a 16).

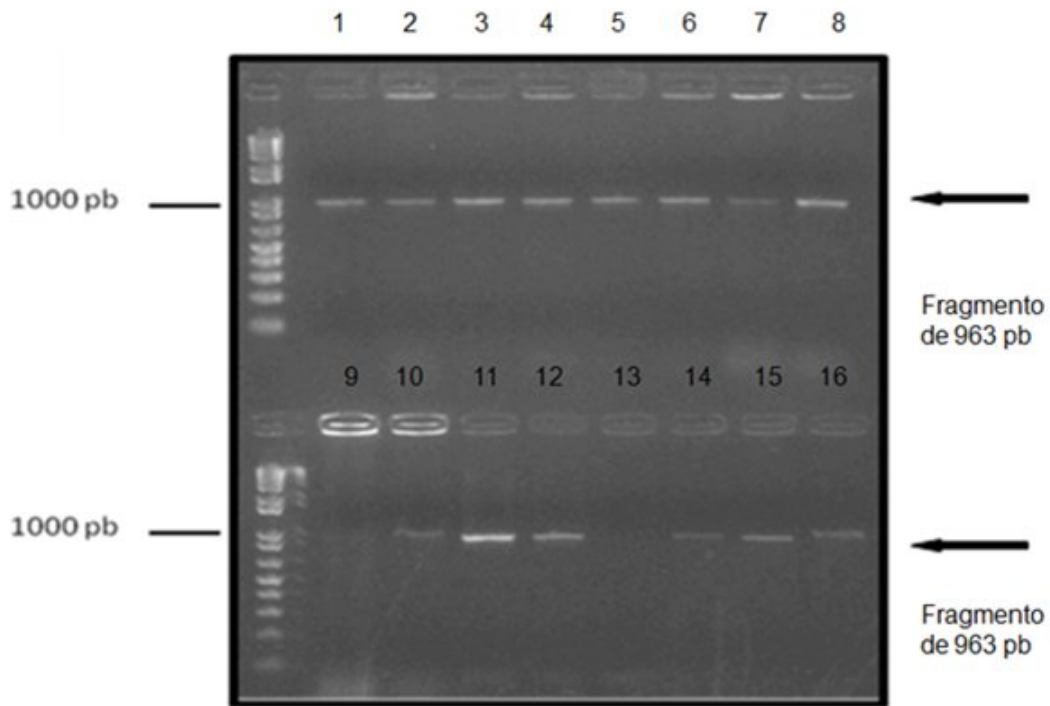


Figura 8. Amplificación del gen del hnRNP A1 por PCR colony de las bacterias transformadas con la reacción de ligación pProEx Hta-A1, la banda amplificada en las colonias positivas se señalan con una flecha.

Expresión y Purificación de la proteína hnRNP A1 recombinante.

Una de las clonas bacterianas que contienen al plásmido pProEx Hta-A1 se utilizó para la expresión de la proteína. Debido a que en la bibliografía no se encontró alguna condición de inducción, se probaron varias concentraciones de IPTG, temperatura, densidad óptica y tiempo de inducción; resultando la condición: DO = 0.6, IPTG = 0.7 mM, Temperatura = 37 °C y tiempo de inducción = 3 h, la que brindo una mejor producción de proteína recombinante (Figura 9, carril I).

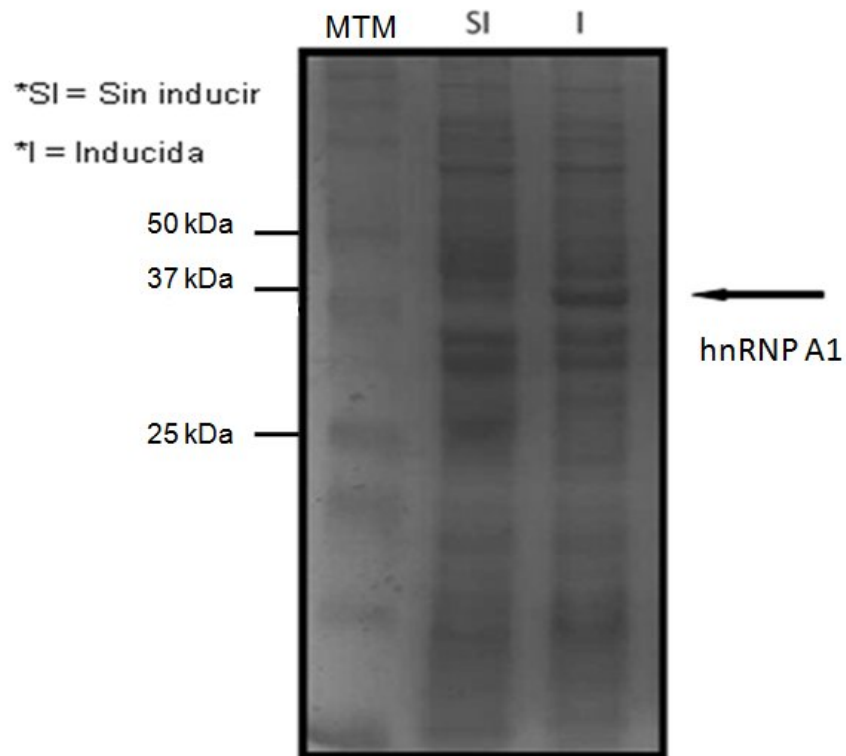


Figura 9. Inducción de la proteína hnRNP A1. Una colonia con el plásmido pProEx Hta- A1 sin inducir (carril SI) e inducida (carril I); se utilizaron las condiciones de inducción de DO = 0.6, IPTG = 0.7 mM por 3 horas a 37 °C. La banda de la proteína inducida, es cercana a la banda del marcador de peso molecular de 37 kDa y se señala con una flecha.

La variación en el peso molecular de la proteína recombinante comparándola con la proteína nativa de 34 kDa, se debe a la adición de histidinas por el vector de expresión pPro Ex Hta. Una vez inducida, la proteína se purificó usando perlas de Ni-NTA. En la Figura 10 A y B se señalan dos diferentes condiciones de elusión de las perlas con 100 mM y 200 mM de imidazol, respectivamente.

A

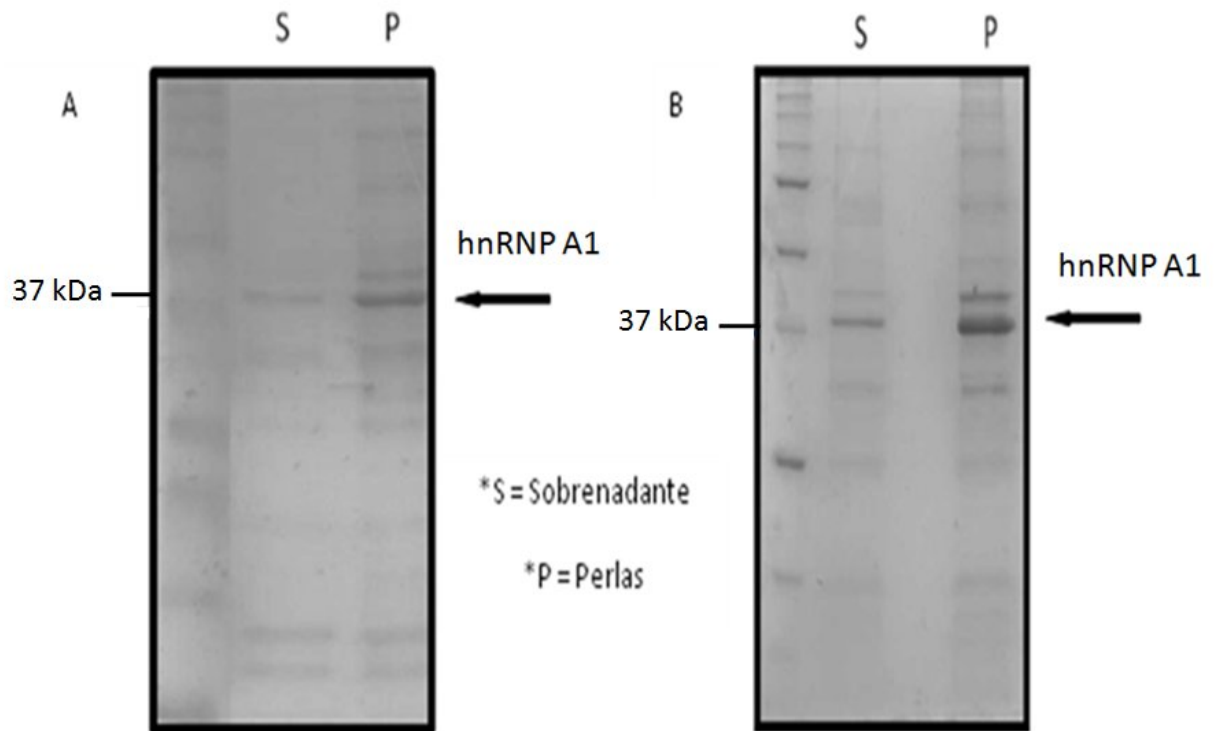


Figura 10. Elusión de la hnRNP A1 de las perlas de Níquel-NTA. Elusión empleando A) imidazol 100mM, B) imidazol 200 mM. En ambos casos se observa que parte de la proteína queda unida a las perlas.

Identificación de la proteína recombinante hnRNP A1.

Finalmente para comprobar que la proteína purificada era realmente la hnRNP A1, se realizó un ensayo de Western Blot utilizando anticuerpos comerciales específicos para la hnRNP A1. Estos anticuerpos fueron capaces de reconocer una banda de aproximadamente 37 kDa en las células inducidas y la proteína purificada (Figura 11 A, carriles I, S - la banda es muy tenue - y P; y Figura 11 B carril E) y no así en las células no inducidas (Figura 11 A y B, carril NI), lo cual corrobora la identidad de la proteína.

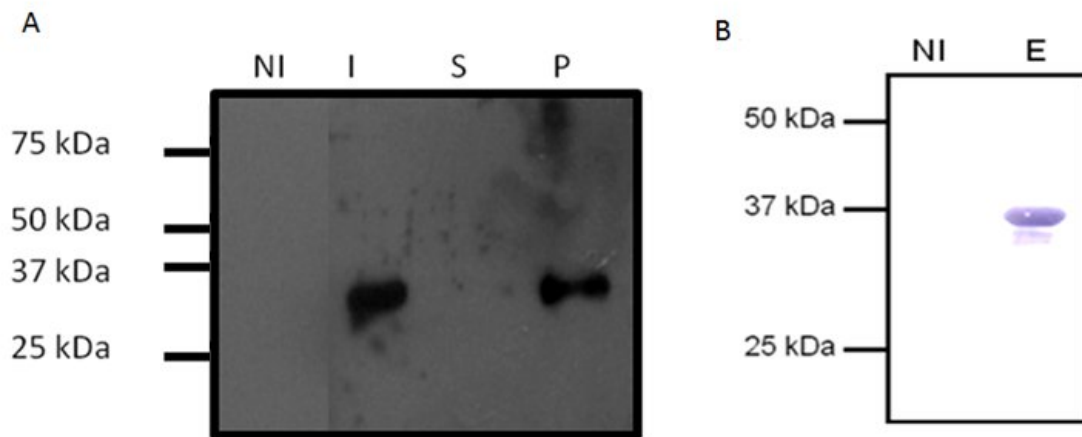


Figura 11. Identificación de la hnRNP A1 con anticuerpos específicos por Western Blot. A) Extractos de bacterias no inducidas (NI), inducidas (I), proteína purificada (P) y proteína eluida (con 100 mM de imidazol) de las perlas de Ni-NTA (S) se migraron por electroforesis en gel de poliacrilamida y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. El anticuerpo anti-hnRNP A1 reacciona con una banda de aproximadamente 37 kDa presente en los extractos I, P y S, y no así en los extractos NI. A la izquierda se señalan los marcadores de Peso Molecular. B) Repetición del Western Blot de extractos de bacterias no inducidas (NI) y proteína eluida (con 200 mM de imdazol) de las perlas de Ni-NTA (E) con el anticuerpo anti-hnRNP A1 revelado con fosfatasa alcalina. A la izquierda se señalan los marcadores de Peso Molecular. El anticuerpo anti-hnRNP A1 reacciona con una banda de aproximadamente 37 kDa en el extracto E y no en el extracto NI.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Los virus son parásitos intracelulares estrictos por lo tanto el éxito de su replicación depende del desarrollo de estrategias de control para utilizar la maquinaria celular en su favor. Por ejemplo, durante el proceso de traducción, algunos virus compiten con los RNAm celulares para poder ser traducidos, mientras que otros han desarrollado mecanismos muy sofisticados que aseguran su traducción inhibiendo simultáneamente la de RNAm los celulares. Particularmente durante la síntesis de proteínas virales y la replicación del RNA viral, las proteínas celulares juegan papeles importantes, como se

ha descrito en virus como el MHV, HCV, etc. Las estrategias de éstos virus de RNA de polaridad positiva son semejantes; sin embargo, su dependencia por diferentes moléculas celulares es muy diversa.

La Ingeniería Genética se ha convertido en la base de muchas investigaciones debido al desarrollo de proteínas celulares recombinantes, lo que ha facilitado el estudio de la biología de los virus. Las proteínas recombinantes permiten obtener más fácilmente y en mayor cantidad a las proteínas de interés. Dado que el NV no se puede cultivar *in vitro*, los ensayos de interacción de su genoma con proteínas celulares recombinantes, y el uso de modelos animales como el *Norovirus murino*, han sido recientemente utilizados para probar el posible papel funcional de éstas proteínas, siendo fundamentales para sentar las bases de sus estrategias de replicación.

El estudio de los mecanismos de replicación del NV acerca cada vez más al desarrollo de tratamientos de prevención y control del virus, ya que hasta la fecha no existe alguno. Entre los avances que se conocen acerca de la posible participación de proteínas celulares en la replicación de NV, en el laboratorio se identificó la interacción del genoma con las proteínas La, PTB, PCBP, PABP y nucleolina⁽⁷⁾. Estas proteínas participan en la síntesis de proteínas virales así como en la síntesis del RNA de diversos virus de RNA de polaridad positiva, por lo que se ha especulado su participación en el ciclo replicativo de NV. Algunas otras proteínas que se unen también al genoma, no han sido identificadas; pero por su peso molecular se ha especulado que podrían ser proteínas ya identificadas para la función de otros virus. Un ejemplo de ello es una proteína de peso molecular de 34 kDa que se une al genoma de NV y que aún no se ha identificado. La proteína se une específicamente a la RNT 5' del NV silvestre pero no lo hace con un mutante de la región 5'; esta interacción diferencial podría sugerir un posible papel regulador. El peso molecular de esta proteína es igual al peso molecular de la hnRNP A1, la cual participa en la replicación viral de virus como el de la hepatitis murina y el virus de la hepatitis C en

humano; por lo cual demostrar su unión al genoma de NV posiblemente podría permitirnos, determinar su función en el ciclo replicativo. Para ello una de las estrategias a seguir es la obtención de la proteína recombinante hnRNP A1.

A partir de la secuencia de la proteína hnRNP A1 humana se obtuvieron oligonucleótidos que permitieron su amplificación a partir de cDNA de células HeLa¹⁷ ya que éste contiene la secuencia de los RNA's editados y con ello podemos asegurar la generación la proteína de interés. Una vez obtenido el gen de hnRNP A1, se clonó en el vector de clonación PJET1/blunt transformando bacterias *E. coli* DH5 α .

El vector PJET1/blunt contiene un gen letal que codifica para la endonucleasa Eco47IR¹⁸, el cual se activa al circularizarse el vector sin inserto; lo anterior permite la selección de clones positivas con base en su supervivencia. Posteriormente se recuperó el inserto, restringiendo el vector con las enzimas EcoRI y XhoI para liberar el gen de la hnRNP A1 y purificándolo por electroelusión.

La secuencia del gen de la hnRNP A1 se ligó en el vector de expresión pProex Hta. Una vez obtenido el plásmido pProEx Hta-A1, éste se propagó en bacterias *E. coli* DH5 α , y la presencia del gen de la hnRNP A1 se corroboró empleando mediante la técnica de PCR colony.

Posteriormente la proteína se expresó a partir de algunas colonias positivas. Debido a que no encontramos en la bibliografía alguna condición de expresión de la hnRNP A1, probamos varias, modificando tanto la temperatura, concentración de IPTG, densidad óptica y tiempo de inducción. Se emplea IPTG como inductor por que el vector de expresión contiene un promotor lac y el IPTG juega el papel de la lactosa activando la expresión de la proteína. Encontramos que se obtiene una mayor concentración de la

¹⁷ Línea celular epitelial humana procedente de un carcinoma cervical.

¹⁸ Endonucleasa característica de *Escherichia coli*, reconoce la secuencia GGWCC de una doble cadena de DNA.

proteína putativa en las condiciones: DO = 0.6, IPTG = 0,7 mM, 3 horas a 37 °C en células inducidas y no así en células no inducidas.

Al observar la proteína recombinante en los geles de poliacrilamida, esta tiene un peso molecular un poco mayor que el peso esperado de 34 kDa. Esto se debe a la presencia de histidinas que se añaden durante la clonación y que, además nos permitieron purificar a la proteína empleando perlas de Ni-NTA, el níquel tiene una fuerte afinidad a las histidinas por lo que la proteína hnRNP A1 se adhiere a las perlas. Se liberó la proteína de las perlas usando imidazol como intercambiador aniónico, la concentración de imidazol de 200 mM nos permitió una mejor recuperación de la proteína a partir de las perlas de Ni-NTA, como se puede observar en la Figura 10 B.

La proteína expresada y purificada asemeja el peso molecular de la proteína hnRNP A1 nativa; sin embargo era necesario comprobar que la proteína expresada era la hnRNP A1, para lo cual realizamos un Western Blot empleando anticuerpos comerciales específicos para la hnRNP A1. Estos reconocieron una banda de aproximadamente 37 kDa, que la proteína que expresaron las bacterias es la hnRNP A1 (Figura 11).

CONCLUSIONES.

Se clonó el gen que codifica para la Ribonucleoproteína heterogéneo nuclear A1 humana en bacterias *E. coli* DH5 α .

Se obtuvo y purificó a la proteína recombinante hnRNP A1.

Se corroboró la identidad de la proteína hnRNP A1 mediante el uso de anticuerpos comerciales específicos contra la hnRNP A1 usando la técnica de Western Blot.

PERSPECTIVAS.

Determinar si la hnRNP-A1 interacciona con el RNA genómico del virus Norwalk.

Determinar su posible función en la replicación de los *Calicivirus*.

REFERENCIAS.

1. Buvoli, M., Biamonti, G., Tsoulfas, P., Bassi, M.T., Ghetti, A., Riva, S. and Morandi, C. *cDNA cloning of human hnRNP protein A1 reveals the existence of multiples RNAm isoforms*. Nucleo Acids Research; Volume 16 number 9, 1988.
2. Clark, I.N. and Lambden P.R. *Organization and Expression of Calicivirus Genes*. The Journal of Infectious Diseases 181: S309-S316, 2000.
3. Clark, I.N. and Lambden, P.R. *The Molecular Biology of Calicivirus*. Journal of General Virology 78: 291-301, 1997.
4. Eperon, I.C., Makarova, O.V., Mayeda A., Munroe, S.T., Cáceres, J.F., Hayward, D.G., and Krainer, A.R. *Selection of Alternative 5' Splice Sites: Role of U1 snRNP and Models for the Antagonistic Effects of SF2/ASF and hnRNP A1*. Mol Cell Biol 20:8303-8318, 2000.
5. Fukushi, S., Kojima, S., Takai, R., Hoshino, F., Oka, T., Takeda, N., Katayama, K. and Kageyama, T. *Poly(A)- and Primer- Independent RNA Polymerase of Norovirus*. Journal of Virology Vol. 78 number 8: 3889-3896, 2004.
6. Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, J., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberté, J-F. and Roberts, L. *Calicivirus Translation Initiation requires an interaction between VPg and eIF4E*. EMBO reports on line, 2005.
7. Gutierréz-Escolano, A.L. *Estrategias replicativas del virus Norwalk*. Cinvestav; Julio-Septiembre: 44-51, 2006.
8. Hardy, M. *Norovirus protein structure and function*. FEMS Microbiology Letters 253: 1-8, 2005.

9. Harris, D., Zhang, Z., Chaubey, B. and Pandey, V.N. *Identification of Cellular Factors Associated with the 3' –Nontranslated Region of the Hepatitis C virus genome*. *Molecular & Cellular Proteomics* 5: 1006-1018, 2006.
10. Huang, P. and Lai, M. *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 binds to the 3'-untranslated Region and Mediates Potential 5'-3'-End Cross Talks of Mouse Hepatitis Virus RNA*. *Journal of Virology* 75.11: 5009-5017, 2001.
11. Kyeong-Ok, C., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Yunjeong, K., Saif, L.J. and Green, K.Y. *Bile acids are essential for porcine enteric Calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1*. *PNAS* 23: 8733-8738, 2004.
12. Kuyumcu-Martinez, M., Belliot, G., Sosnovtsev, S.V., Chang, K-O., Green, K.Y. and Lloyd, R.E. *Calicivirus 3C-like Proteinase Inhibits Cellular Translation by Cleavage of Poly (A)-Binding Protein*. *Journal of Virology* 78: 8172-8182, 2004.
13. Lindberg, A. *Viruses as a Model System for studies of Eukariotic RNAm Processing*. Uppsala ISBN 91-554-5775-4, 2003.
14. Reyes del Valle, J and del Ángel, R.M. *Isolation of putative dengue virus receptor molecules by affinity chromatography using a recombinant E protein ligand*. *Journal of Virological Methods* 116:95-102, 2004.
15. Shi, S.T., Huang, P., Li, H-P., Lai, M. C. *Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates RNA synthesis of a cytoplasmic virus*. *The EMBO journal* 19: 4701-4711, 2000.
16. Wobus, C.E., Karst, S.M., Thackray, L.B., Chang, K-O., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J.M., Green, K.Y. and Virgin, H.W. *Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages*. *Plos Biology* 2: 2076-2084, 2004.
17. Wobus, C.E., Thackray, L.B and Virgin, H.W. *Murine Norovirus: a Model System to Study Norovirus Biology and Pathogenesis*. *Journal of Virology* 80:5140-5112, 2006.

18. Xu, R-M., Jokhan, L., Cheng, X., Mayeda, A. and Krainer, A.R. *Crystal structure of human UP1, the domain of hnRNP A1 that contains two RNA-recognition motifs*. *Genes & Development* 13: 1102-1115, 1999.
19. Zhang, X., Li, H-P., Duncan, R., Comai, L. and Lai, M.C. *Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 binds to the transcription-regulatory region of mouse hepatitis virus RNA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9544-9549, 1997.
20. Zhao, X. *Regulation of Human Papillomavirus Type RNAm Splicing and Polyadenylation*. Uppsala ISBN 91-554-6328-2, 2005.

ANEXO.

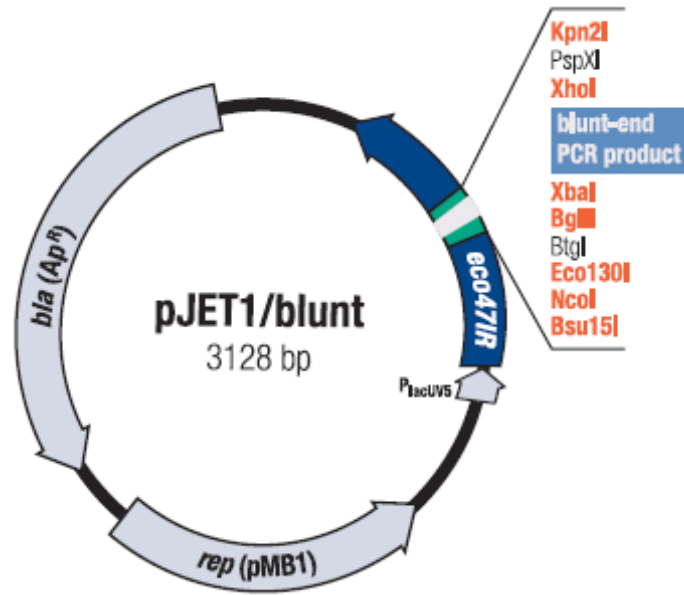


Figura 12. Mapa del vector pJet1/blunt.

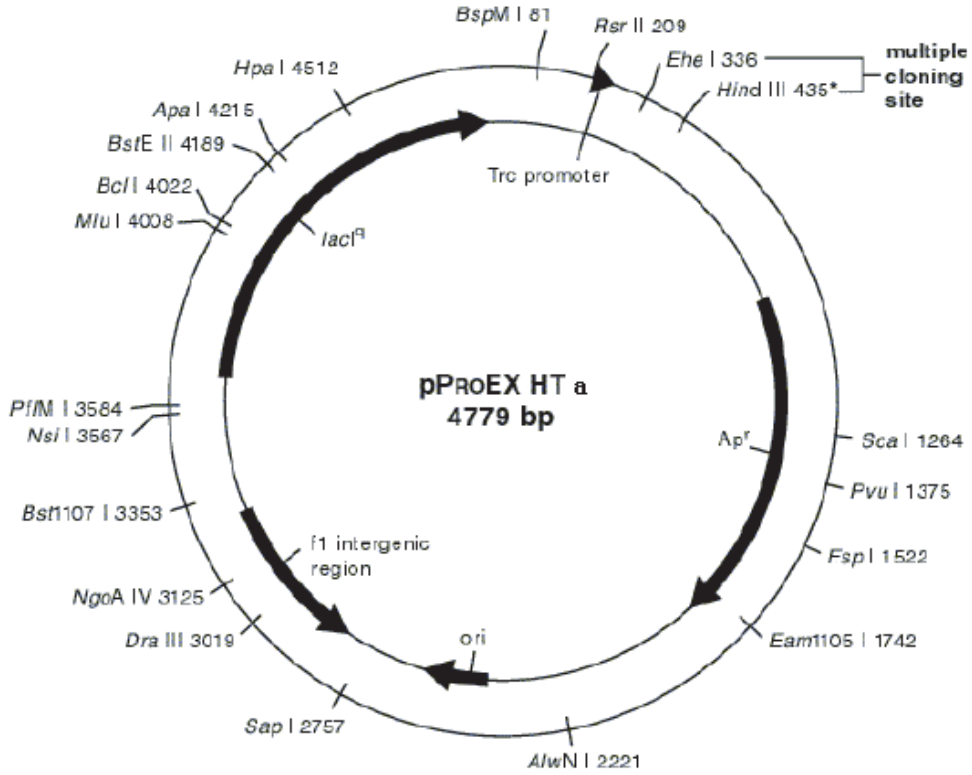


Figura 13. Mapa del vector pProEx Hta.

Tabla 1. Tabla de abreviaturas.

Abreviatura	Significado
%p/v	Por ciento peso – volumen
%v/v	Por ciento volumen – volumen
3A	Proteína viral con función desconocida
3C	Proteasa codificada por los <i>Calicivirus</i>
3D o RdRp	Replicasa viral
BSA	Albúmina
CAP	Proteína activadora de catabolito
DNAsa	Enzima degradadora de DNA
dNTP's	Dinucleótidos trifosfatados
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcoRI	Enzima de restricción EcoRI
HCV	Virus de la Hepatitis C en humanos
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogéneo nuclear
hnRNP A1	Ribonucleoproteína Heterogéneo nuclear A1 humana
HuCVs	<i>Calicivirus</i> humanos
IPTG	Isopropil – β – D - tio- galactósido
MHV	Virus de hepatitis de ratón
MTM	Marcadores de Peso Molecular
Ni – NTA	Perlas que tienen en su superficie níquel – ácido nitrilotriacético
NTPasa	Nucleósido trifosfatasa
NV	Virus Norwalk
ORF	Marco de lectura abierto
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PJET1/blunt	Vector de colación (Fermentas)
PJET1/bluntA1	Vector de clonación PJET1/blunt que contiene el gen de la hnRNP A1
pProEx Hta	Vector de expresión (Invitrogen)
PProExHta-A1	Vector de expresión pProEx Hta que contiene el gen de la hnRNP A1
RBD	Dominio de unión con el RNA
RNA	Ácido Ribonucleico

Abreviatura	Significado
RNA (-)	Cadena de RNA de polaridad negativa
RNA (+)	Cadena de RNA de polaridad positiva
RNAm	RNA mensajero
RNAsa	Enzima degradadora de RNA
RNP	Complejo de Ribonucleoproteínas
RNT	Región no traducida
U	Unidad expresada de actividad enzimática
VP1	Proteína mayoritaria de la cápside
VP2	Proteína minoritaria de la cápside
Vpg	Proteína viral g
XhoI	Enzima de restricción XhoI

Tabla 2. Nomenclatura.

Abreviatura	Significado
°C	Grado centígrado
μL	Micro litro
h	Hora
kb	Kilo bases
kDa	kilo Daltons
mL	Mili litro
mM	Milimolaridad
N	Normalidad
ng	Nano gramo
nm	Nano metro
pb	Pares de bases
rpm	Revolución por minuto
V	Volts