UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

I Z T A P A L A P A

Casa abierta al tiempo

090986

CONSTRUCCION DE UNA MUTANTE DE LA PROTEINA 2C DE POLIOVIRUS Y EVIDENCIA SOBRE SU FUNCION.

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

p r e s e n t a

MARIA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ

MEX. 1989

090986

CONSTRUCCION DE UNA MUTANTE DE LA PROTEINA 2C DE POLIOVIRUS Y EVIDENCIA SOBRE SU FUNCION

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL, PRESENTA LA BIOLOGA

MARIA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ

LA MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA
CUENTA CON EL APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
(CONACYT) A TRAVES DEL SUBSIDIO 2115-007945 PARA
EL FORTALECIMIENTO DEL POSGRADO NACIONAL

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN, BAJO LA DIRECCION DEL DR. CARLOS FERNANDEZ-TOMAS

AGRADECIMENTOS

AGRADEZCO AL DR. CARLOS FERNANDEZ-TOMAS POR SU AYUDA Y DIRECCION EN LA ELABORACION DE ESTE TRABAJO

AL DR. GUSTAVO VINIEGRA Y AL DR. MIGUEL BETANCOURT POR SU VALIOSA ASESORIA Y REVISION DEL MANUSCRITO

A LA M. EN C. CONCEPCION GUTIERREZ POR SU APOYO Y ORIENTACION

A LA DRA. ROSA MARIA DEL ANGEL, AL DR. JOSE TAPIA Y A LA BIOL. ALEJANDRA SANCHEZ, POR SUS CONSEJOS Y COLABORACION EN EL TRABAJO EXPERIMENTAL

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO POR SU AYUDA Y AMISTAD

A LAS SIGUIENTES INSTITUCIONES CUYO APOYO Y FACILIDADES HICIERON POSIBLE LA CULMINACION DE ESTA TESIS: UAM-I, CINVESTAV-IPN, CONACYT, UNAM Y SERVITIPOS.

A JAVIER

A MIS HERMANOS:

LIDIA, CARLOS, EDITH Y HECTOR

A MIS PADRES:

CARLOS Y ERNESTINA

INDICE

RESUMEN 1

INTRODUCCION 3

a) MOTIVACION DEL ESTUDIO 3

b) GENERALIDADES SOBRE LA POLIOMIELITIS 3

c) EL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS 5

d) CICLO LITICO DE POLIOVIRUS 5

e) SINTESIS DE PROTEINAS Y PROCESAMIENTO PROTEOLITICO 8

f) REPLICACION VIRAL 10

g) ANTECEDENTES DIRECTOS 15

h) OBJETIVOS E HIPOTESIS 16

MATERIALES 19

a) MATERIAL BIOLOGICO 19

b) MEDIOS DE CULTIVO 19

c) SOLUCIONES Y MEZCLAS 19

d) COMPOSICION Y PREPARACION DE OTROS MATERIALES 26

METODOS 29

a) MAXIPREPARACION DE PLASMIDO PARA CONSTRUCCIONES GENETICAS 29

b) PURIFICACION DE PLASMIDO POR COLUMNA DE SEFAROSA 30

c) RESTRICCION DE DNA 31

d) ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA 32

e) PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSION 32

f) TRATAMIENTO CON DNA POLIMERASA-T4 33

g) INSERCION DE "LINKERS" 34

h) LIGACION DE DNA 35

i) PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES 35

j) TRANSFORMACION 36

k) MINIPREPARACION DE PLASMIDOS 37

l) EXTRACCION DE PLASMIDO PARA TRANSFECCION 37

m) TRANSFECCION DE DNA A CELULAS 293 39

n) TITULACION DE VIRUS PRODUCTO DE LA TRANSFECCION 40

ñ) TINCION DE PLACAS CON CRISTAL VIOLETA-ETANOL 41

RESULTADOS 42

a) INSERCION DE "LINKERS" EN EL PLASMIDO pV1-120 42

b) CLONACION DE LA SECUENCIA 2C DE pV1-120-M1 EN pSV-O-POLIO 54

c) TRANSFECCION DE DNA A CELULAS 293 62

d) PRODUCCION DE VIRUS MEDIANTE COTRANSFECCION DE pSV-O-POLIO-M3 Y pSV-23 65

DISCUSION Y CONCLUSION 71

REFERENCIAS 82

APENDICE 92

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

1.- Organización del genoma de Poliovirus 7

2.- Replicación de Polio. Modelo de la "horquilla" de replicación 12

3.- Replicación de Polio. Modelo de VPg-pU-pU 14

4.- Patrón de restricción del plásmido pSV-O-Polio 43

5.- Mapa de restricción del DNAc de Poliovirus 44

6.- Patrón de restricción del Plásmido pV1-120 45

7.- Inserción de "linkers" en el sitio NsiI de la región de la proteína 2C 47

8.- Patrón de restricción de pGEM-4. Ensayo KpnI-DNA Polimerasa-T4 48

9.- Actividad de la DNA-Pol-T4 49

10.- Inserción de "linkers" XhoI en pV1-120 53

11.- Selección de candidatos de pV1-120-M1 55

12.- Patrón de restricción de pV1-120 y pV1-120-M1 56

13.- Construcción del plásmido pSV-O-Polio-M3 58

14.- Selección de candidatos del plásmido pSv-O-Polio-M3 61

15.- Diferencias en en patrón de restricción entre pSV-O-Polio y pSV-O-Polio-M3 63

16.- Patrón de restricción de pSV-O-Polio-M3 64

17.- Formación de placas después de transfección 66

18.- Construcción del plásmido pSV-23 68

19.- Modelo de recombinación entre genomas de RNA 79

20.- Modelo de recombinación entre genomas de RNA23 y RNAM3 81

LISTA DE TABLAS

TABLA

1.- Números de transformación. Inserción de "linkers" XhoI en el plásmido pV1-120 ____ 52

2.- Números de transformación. Clonación de la región 2C de pV1-120-M1 en pSV-O-Polio. ____ 59

3.- Eficiencia de transfección ____ 70

RESUMEN

El virus de la Poliomielitis está formado de una cadena sencilla de RNA de polaridad (+) de alrededor de 7,500 nucleótidos, que constituyen el genoma viral. Este RNA codifica una sola poliproteína que es proteolíticamente procesada durante la traducción para dar lugar a todas las proteínas virales. Las proteínas para la cápside viral se localizan en el extremo amino-terminal de la región P1. En la región central P2 se encuentra la proteasa viral 2A y dos proteínas de función desconocida 2B y 2C. Hacia el extremo carboxilo-terminal (P3) se localiza la polimerasa viral (3D), una proteasa (3C) y la proteína VPg, que se encuentra unida por el extremo 5' al genoma viral.

La proteína 2C ha sido poco estudiada. Sin embargo, mutaciones que producen resistencia y/o dependencia a Guanidina, un inhibidor de la replicación viral, se localizan en la región del genoma viral que codifica para 2C. Esta información ha sugerido que la proteína 2C se encuentra involucrada en la síntesis de RNA viral.

El genoma de Poliovirus tipo I (Mahoney) ha sido clonado y secuenciado. La "infección" de células en cultivo con el DNAc de Poliovirus clonado en un plásmido de expresión eucariótica, ha permitido la producción de virus infecciosos. Estos hechos han abierto la posibilidad de construir mutantes en genes y sitios precisos, localizando de esta manera funciones virales específicas.

En el presente trabajo, con la finalidad de estudiar la función de la proteína 2C, se construyó una mutante en la región del genoma viral que codifica para este péptido. La estrategia general para la construccion se realizó mediante inserción de "linkers". La mutante construída denominada pSV-O-polio-M3 contiene un inserto de 10 pb en la posición 4826 del genoma viral, lo que daría como resultado la inserción de tres aminoácidos en la proteína 2C, conservando la secuencia de los mismos a lo largo de la poliproteína.

Para analizar el efecto de la mutación en las funciones virales, se realizaron transfecciones a células 293 con los plásmidos pSV-O-polio (silvestre) y pSV-O-polio-M3 (mutante). Las transfecciones se llevaron a cabo por el método del fosfato de calcio. Se observó formación de virus infecciosos después de la transfección con pSV-O-polio. Sin embargo, no hubo producción de virus cuando las células fueron transfectadas con el plásmido mutante a 37 C ni tampoco a 32 C.

Virus con resistencia y/o dependencia a Guanidina, presentan mutaciones en la región que codifica para 2C. Para analizar una posible dependencia a la droga, se realizaron transfecciones con la mutante construída en presencia del inhibidor. Tampoco hubo recuperación de virus en estas condiciones. No obstante, se observó producción de virus infecciosos cuando células 293 fueron cotransfectadas con la mutante pSV-O-polio-M3 y una subclona del DNAc de polio (pSV-23) que carece de la región P1 (que codifica para proteínas de cápside) pero mantiene la región para 2C intacta y evidentemente no produce virus por si mismo.

Estos resultados sugieren que la proteína 2C es esencial para el

crecimiento viral puesto que 2C se encuentra altamente conservada entre picornavirus. La inserción de tres aminoácidos pudo ser demasiado drástica para su función. La mutación pudo afectar su correcto procesamiento debido a alteraciones en la estructura secundaria de la poliproteína, o bien alterar sus sitios funcionales. Se sugiere que la mutación es letal específicamente para la replicación viral.

Por otra parte, el hecho de que la cotransfección con pSV-O-polio-M3 y pSV-23 produzca virus infecciosos, puede ser explicado por un proceso de recombinación.

INTRODUCCION

a.) MOTIVACION DEL ESTUDIO

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento del ciclo de replicación del virus de la Poliomielitis, mediante la manipulación genética del DNAc viral, para la construcción de una mutante y el análisis fenotípico de la misma. Tal mutación se localiza en la región que codifica para la proteína 2C (Figura 1), la cual no tiene bien asignada una función. Sin embargo se sospecha que participa en la iniciación de la replicación.

Este estudio forma parte de una línea de trabajo desarrollada en el Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, en el laboratorio dirigido por el Dr. Carlos Fernández-Tomás, quien desde hace más de 15 años ha contribuído al conocimiento de la Biología Molecular del virus.

Con este y otros estudios similares realizados en el laboratorio, se pretende aclarar el papel de la proteína 2C y probablemente se pueda contar con más conocimientos sobre la biología del virus de la Poliomielitis, agente causal de una enfermedad de gran importancia epidemiológica.

b.) GENERALIDADES SOBRE LA POLIOMIELITIS

La Poliomielitis es una infección viral aguda en la que sólo un pequeño porcentaje de los sujetos infectados desarrolla signos clínicos como fiebre, dolor de cabeza, rigidez de nuca y espalda y, algunas veces parálisis de diversos grupos musculares (Berkow, 1978).

El virus de la Poliomielitis penetra por vía alimenticia y se localiza en la orofaringe y en el intestino donde se multiplica. La infección generalmente termina en esta fase, que es totalmente asintomática. Sin embargo en ocasiones, el virus se difunde al torrente circulatorio, y puede alcanzar al sistema nervioso central, destruyendo las astas anteriores de la médula espinal, con pérdida de la función motora de los grupos musculares correspondientes al daño neuronal. Las células nerviosas destruídas no se regeneran, por lo que el daño funcional es irreparable. Afortunadamente con el desarrollo de la vacuna oral contra poliomielitis (OPV) la enfermedad se ha prevenido ampliamente aún en regiones tropicales y subtropicales (Sabin, 1985).

La vacuna oral contra la Poliomielitis (OVP), es del tipo de las llamadas "atenuadas". Para el desarrollo de tales vacunas, las cepas virulentas (infectivas) se atenuan mediante su multiplicación en un huésped no natural. La multiplicación sucesiva en dicho huésped, tiende a conservar la capacidad antigénica de dicho virus, así como a disminuir su capacidad infectiva. Sin embargo, existe el peligro de reversión de cepas atenuadas a cepas virulentas, es decir infectivas, después de pasajes sucesivos a través de su huésped natural. De esta manera se han localizado algunos brotes de parálisis poliomielítica, aún en países desarrollados, donde la enfermedad se había erradicado casi completamente, como es el caso de Finlandia en 1984 (Hughes y cols., 1986).

En la actualidad las investigaciones en torno al virus de la poliomielitis se han encaminado principalmente al estudio a nivel molecular y genético de las funciones virales, para entender mecanismos importantes como es el de patogenia viral, atenuación y

virulencia. El conocimiento preciso de estos eventos podría sugerir caminos para modificar la OPV e incrementar su eficiencia.

c.) EL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS

El virus de la Poliomielitis pertenece a la familia Picornaviridae, género Enterovirus (Rekosh, 1977). Existen tres diferentes serotipos del virus, causando una enfermedad idéntica y son muy similares en estructura y composición. Es una partícula pequeña, aproximadamente de 26 nm de diametro, simétrica e icosaédrica, de alrededor de 60 unidades estructurales que constituyen la cápside viral. Cada unidad estructural contiene una copia de cada una de las proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4 (Hogle y cols. 1985).

El genoma del virus consiste en una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva (+), esto es, la misma que el RNA mensajero (RNAm) viral. Se ha calculado que la molécula de RNA tiene un PM de $2.6x10^6$ daltones que corresponde a 7,500 nucleótidos. La molécula de RNA está covalentemente unida por el extremo 5' a una proteína de 22 aminoácidos denominada VPg (Wimmer, 1982) y, por el extremo 3' tiene una secuencia de poli(A) (Spector y Baltimore, 1975). Tiene además una región de 742 nucleótidos por el extremo 5' y otra de alrededor de 60 nucleótidos por el extremo 3' que no se traducen (Kitamura y cols.,1981) (Figura 1).

d.) CICLO LITICO DE POLIOVIRUS

El primer evento en el ciclo replicativo de Polio, es la

adsorción del virus a células susceptibles, como son las células humanas o células de simio. Este paso está determinado por la interacción de la cápside viral con receptores específicos que se encuentran en la superficie de la membrana celular (Lomberg-Holm, 1975) que aún no se han identificado. Este fenómeno es poco dependiente de temperatura (Davis y cols., 1980; Schrom y cols., 1982). Posteriormente viene la penetración, proceso altamente dependiente de la misma (Davis y cols., op. cit.). La introducción del genóma viral a la célula involucra también penetración de proteínas estructurales (Cantero-Aguilar y cols., 1987). Recientemente se demostró que la partícula viral intacta penetra a la célula huésped por endocitosis mediada por el receptor de membrana (Willingmann y cols., 1989). El desnudamiento del RNA sobreviene después, cuando las partículas virales alcanzan el medio ácido de endosomas y/o lisosomas (Willinngmann y cols., op.cit.).

Una vez que el RNA ha penetrado a la célula, es procesado por una enzima celular (Ambros y cols., 1978) que elimina a la proteína VPg del extremo 5' del genoma viral (Ambros y cols., op.cit.; Dorner y cols., 1981). El RNA funciona entonces como RNAm para la síntesis de proteínas virales. Paralelamente se lleva a cabo el procesamiento proteolítico, la replicación del genóma viral y la alteración de las funciones del huésped. Estas últimas comprenden primero la inhibición de la síntesis de proteínas, seguidas de inhibición en la transcripción y la síntesis de DNA celular.

Por último se lleva a cabo la morfogênesis del virión que incluye la agrupación inicial de las proteínas estructurales VP0, VP3 Y VP1 (Figura 1) formando la procápside (Jacobson y Baltimore, 1973). Enseguida se lleva a cabo la asociación de esta última con una

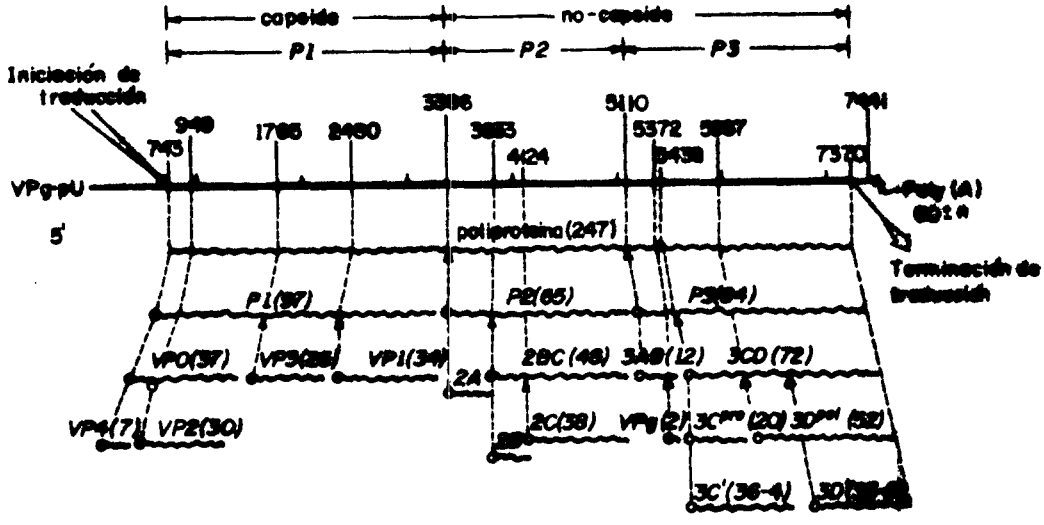


FIGURA 1.- Organización del genoma de Poliovirus. El genoma de Polio contiene a la proteína VPg unida covalentemente al extremo 5' y una secuencia de poli(A) por el extremo 3'. Los números arriba de la línea de RNA refieren el primer nucleótido del codón del extremo amino-terminal de las proteínas virales. La división en tres regiones: P1, P2 y P3 corresponde a rompimientos rápidos de la poliproteína. Los números en parentesis corresponden a los pesos moleculares de las proteínas en kilodaltones (tomado de Wimmer y cols., 1987).

molécula de RNA que dará lugar al "provirión" (Fernandez-Tomás y Baltimore, 1973). Finalmente como último paso en la morfogênesis, la proteína VP0 es procesada a VP4 y VP2 (Putnack y Phillips, 1982) formando el virión maduro, el cual es liberado después de la lisis celular.

Todos los eventos del ciclo de multiplicación viral se llevan a cabo en el citoplasma de la célula.

e.) SINTESIS DE PROTEINAS Y PROCESAMIENTO PROTEOLITICO

La síntesis de proteína viral se realiza en los polirribosomas. Aparentemente el RNA de polaridad (+) es capaz de unirse a ellos por la región no traducida del extremo 5' (Currey y cols., 1986).

El RNAm de Poliovirus es monocistrónico, es decir, presenta para la síntesis de proteínas un sitio único de iniciación AUG a 743 nucleótidos del extremo 5' y un sólo sitio de terminación (UAG) a 72 nucleótidos del segmento de poli(A) del extremo 3' (Figura 1), dando lugar a una sola poliproteína que es procesada durante la traducción.

La poliproteína se procesa primeramente en tres regiones. En la región del grupo amino terminal, esto es, el extremo 5' del RNA (P1), se encuentran los genes para las proteínas de la cápside VP4, VP2, VP3 Y VP1. La región central (P2) codifica para la proteasa viral 2A (también denominada 2Apro o P2A) y para las proteínas 2B y 2C (P2B y P2C). La proteína 2A participa en el procesamiento de la poliproteína viral y aparentemente también interviene en la inhibición de la traducción del RNAm del huésped (Bernstein y cols., 1985; Lloyd y cols., 1986; Konig y Rosenwirth, 1988), procesando el factor celular

p220, indispensable para la formación del complejo de iniciación de la traducción celular.

La función de 2B y 2C es desconocida. No obstante, algunas alteraciones en 2B han producido mutantes deficientes en la replicación viral (Bernstein y cols.,1986) y se ha encontrado que el "locus" de resistencia a Guanidina que es un inhibidor de replicación viral, se encuentra en la región del gene para 2C (Pincus y Wimmwe, 1986; Pincus y cols., 1986).

Por último, la región del grupo carboxilo (P3), incluye los genes para la replicasa viral 3Dpol (P3D), para la proteasa 3Cpro (P3C) y para la proteína de 22 aminoácidos unida al extremo 5' del genoma viral, VPg (P3B).

Se ha demostrado que en el procesamiento de la poliproteína intervienen 2 proteasas virales: 2Apro y 3Cpro, mismas que actúan como sulfhidril-proteasas (Gorbalenya y Svitkin, 1983; Ivanoff y cols., 1986; Konig y Rosenwirth, op.cit.). La primera corta entre los pares de aminoácidos tirosina-glicina (Toyoda y cols., 1986) que se encuentran entre la región P1 y P2 (ver Figura 1) y, como procesamiento alternativo, que al parecer no tiene un significado biológico (Wimmer y cols., 1987), corta dentro de la proteína 3CD, para dar lugar a 3C' y 3D'. La proteasa 3Cpro rompe siempre entre uniones glutamina-glicina (Hanecak y cols., 1982; 1984) en 8 sitios específicos. Además de que se autoprocesa, libera a la polimerasa viral 3Dpol, así como a las proteínas VPg (P3B) y 3A, aparentemente después de que la región 3B (VPg) de su precursor 3AB que se encuentra asociado al complejo replicativo en membranas, ha sido uridilado (Takegami y cols.,, 1983; Takeda y cols., 1986). Asimismo, se encarga de procesar también a las proteínas de la región P2, actuando en

"trans" y liberando así a 2C, 2B y 2Apro. Por último, 3C también procesa parte de la región P1 (región que ha sido liberada por 2Apro) dando lugar a VPO, VP3 y VP1. Finalmente VPO sufre un procesamiento para formar VP2 y VP4, último paso en la morfogénesis del virión. Tal rompimiento que se efectúa entre asparagina-serina no depende de las proteasas virales.

Un aspecto interesante de la traducción del RNAm de polio es el hecho de que, a diferencia de la mayoría de los RNAm celulares, carece de la estructura conocida como "cap" (residuo de guanina metilada en la posición 7) en el extremo 5', de modo que la iniciación de la traducción reconoce otras características del RNA. Aparentemente la región 5' del genoma viral, región de 743 nucleótidos que no se traduce, juega un papel importante en este proceso (Currey y cols., 1986; Pelletier y cols., 1988), así como en el reconocimiento del triplete de iniciación AUG correcto del RNAm viral para la traducción (Del Angel y cols. 1989), ya que el RNA de polio contiene varios tripletes de esta naturaleza.

f.) REPLICACION VIRAL

La replicación viral es un proceso que implica necesariamente la síntesis de gran cantidad de cadenas de RNA de polaridad (+), primeramente mediante "transcripción" directa del RNA del virión (polaridad +), para sintetizar cadenas complemenarias de RNA (-), que a su vez funcionarán como templados para subsecuentes cadenas de RNA (+).

Este fenómeno no se ha entendido completamente. Sin embargo se

sabe que se lleva a cabo en sistemas membranosos y que se encuentran implicados varios factores:

1) La RNA polimerasa dependiente de RNA (3Dpol), proteína viral que se encuentra en la región P3 de la poliproteína (Figura 1).

2) La proteasa viral (P3C) denominada 3Cpro, ya mencionada anteriormente como implicada en el procesamiento de la poliproteína.

3) La proteína VPg (P3B) que se encuentra covalentemente unida al genoma viral por el extremo 5' y que es codificada en la región P3 del genoma viral.

4) La proteína 2C (P2C), implicada en el fenómeno de resistencia y/o dependencia al inhibidor de replicación viral Guanidina (Pincus y cols., 1986), que se localiza en la región P2 de la poliproteína.

5) La proteína 2B (P2B) localizada en la misma región que 2C. Siendo que alteraciones en la región que codifica para 2B producen mutantes deficientes en replicación (Berstein y cols., 1986).

6) Las regiones no traducidas localizadas en los extremos 5' y 3' del genoma viral, son importantes en la regulación de replicación (Kuge y Nomoto, 1987; Sarnow y cols., 1986; Bernstein y cols., 1986).

7) Un factor celular, que probablemente funcione como uridil-transferasa-terminal (Andrews y Baltimore 1986).

Se han propuesto dos modelos para explicar el fenómeno de replicación. El primero de ellos se basa principalmente en experimentos realizados in vitro (Youg y cols., 1985; Hey y cols., 1986; Andrews y cols., 1985; Andrews y Baltimore, 1986) e implica primeramente la formación de una "horquilla" de replicación en el extremo 3' del templado de RNA (Figura 2). Esta "horquilla" se formaría por la actividad de un factor celular que actuaría como una

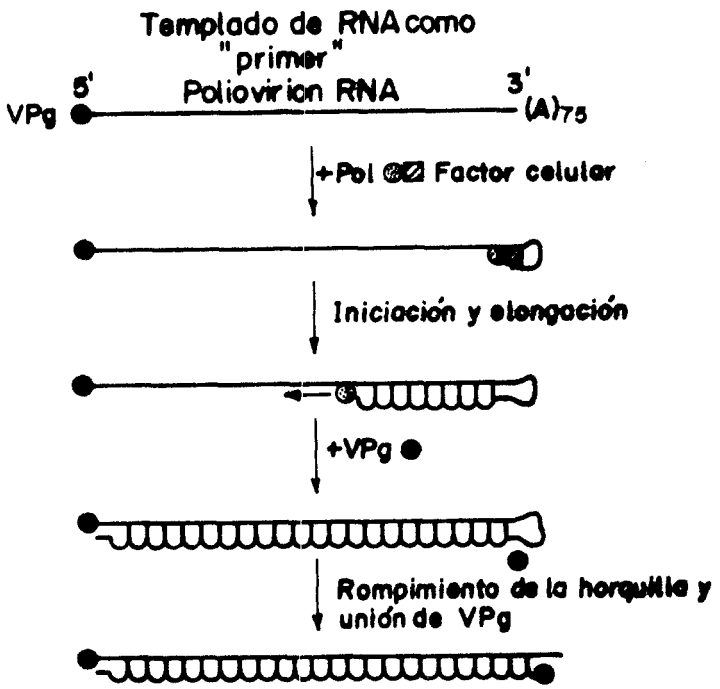


FIGURA 2.- Replicación de Polio. Modelo de la "horquilla" de Replicación. El modelo se basa en el papel del templado de RNA como "primer" en el inicio de la síntesis de RNA. Implica la formación de una "horquilla" por el extremo 3' del RNA, en cuya formación interviene probablemente un factor celular (uridil-transferasa). Después de la elongación de la cadena de RNA, VPg podría romper la horquilla y unirse por el extremo 5' (tomado de Wimmer y cols., 1987).

"uridial-transferasa-terminal" y serviría como iniciador ("primer") para la RNA Polimerasa viral (3Dpol). El papel de esta última sería únicamente la elongación de la nueva cadena de RNA. Por último, el modelo implica la existencia de un factor capaz de romper la horquilla de replicación, función que podría cumplir la proteína VPg, para posteriormente unirse al extremo 5' de la cadena naciente. Sin embargo, no existen evidencias de la actividad de VPg sobre la horquilla y, por otra parte, el modelo no explica la iniciación de la síntesis de RNA sobre el extremo 3' de las cadenas de RNA de polaridad (-).

El segundo modelo se basa en evidencias de experimentos realizados principalmente mediante el uso de "complejos de replicación" asociados a membranas aisladas de células infectadas (Etchinson y Ehrenfeld, 1981; Takeda y cols., 1986) que se acercan un poco más a los procesos realizados in vivo. El modelo propone (Takegami y cols., 1983) que la proteína 3AB (Figura 1), la cual es precursora de VPg y se encuentra asociada a membranas (Kuhn y cols., 1988), es primeramente uridilada probablemente por un factor celular (uridil-transferasa) y subsecuentemente procesada por la proteasa viral 3C (3Cpro). Así se libera VPg ya uridilada, es decir VPg-pU-pU. Esta última serviría como "primer" en la iniciación de la síntesis de RNA (Baron y Baltimore, 1982; Kitamura y cols.,1980; Takegami y cols., 1983) para la elongación de la cadena por la polimerasa viral. Estas proteínas, junto con el RNA forman el llamado "complejo replicativo" asociado también a las proteínas 2C y 2B (P2C y P2B), cuya posible función dentro del proceso de replicación es desconocida. El modelo es válido tanto para síntesis de cadenas de RNA (+) al igual que para síntesis de cadenas (-).

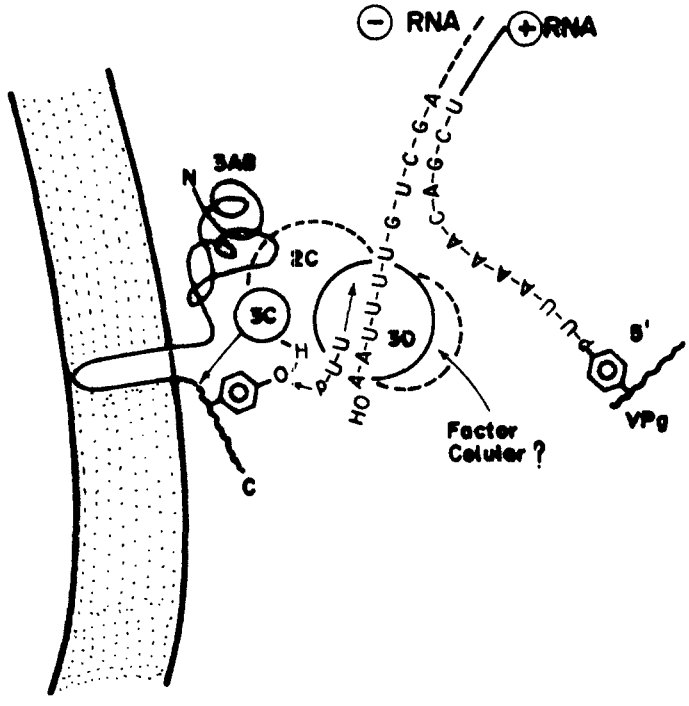


FIGURA 3.- Replicación de Polio. Modelo de VPg-pU-pU como "primer" en la Replicación. El esquema representa el "complejo replicativo" de Polio asociado a membrana. Aparentemente, la proteína 3AB, se encuentra asociada a membranas y es la precursora de VPg. La proteasa 3C liberaría a VPg después de haber sido uridilada por un posible factor célular, y en ese momento VPg-pU-pU funcionaría como "primer" para iniciar la síntesis de RNA por la polimerasa viral 3D. El papel de la proteína 2C es desconocido (Tomado de Wimmer y cols.,1987).

Por último, las regiones no traducidas 5' y 3' del genoma viral, podrían estar involucradas en la selección del templado, ya sea RNA (+) o RNA (-) para iniciar la replicación siempre a partir del extremo 3'. Aparentemente los pêptidos virales involucrados reconocen estructuras primarias y secundarias, determinadas por las secuencias de ambos extremos. Asimismo pueden establecerse interacciones de estos extremos con otras regiones del RNA lejanas (Wimmer y cols., 1987).

g.) ANTECEDENTES DIRECTOS

Un aspecto interesante del desarrollo de los conocimientos de la biología molecular y la genética de Poliovirus, ha sido la posibilidad de experimentar directamente sobre el genoma viral. Esta oportunidad ha sido brindada primeramente por la secuenciación del genoma completo de polio (Van der Werf y cols., 1981; Racaniello y Baltimore 1981a) y en segundo lugar por la construcción de clonas con el DNAc del mismo, capaces de producir virus infecciosos mediante su introducción a células de mamífero, es decir, mediante transfección (Racaniello y Baltimore, 1981b; Semler y cols., 1984, Omata y cols., 1984). De esta manera es posible la construcción de mutantes en genes y sitios precisos, al igual que la observación del efecto producido por dicho cambio, localizando así funciones virales específicas.

Se mencionó anteriormente que el fenómeno de replicación viral no ha sido completamente entendido y que la función de la proteína 2C (P2C) es desconocida. Se ha encontrado sin embargo, en base a estudios genêticos, que mutantes resistente y/o dependientes al inhibidor de replicación viral Guanidina presentan alteraciones precisamente en la

región que codifica para 2C (Pincus y cols., 1986).

h.) OBJETIVOS E HIPOTESIS

El objetivo del presente trabajo fue la construcción de una mutante en la región del genoma viral que codifica para la proteína 2C, con la finalidad de estudiar la función de dicha proteína. El DNAc de poliovirus se encuentra clonado en el plásmido bacteriano pBR322 y dirigido por el promotor del virus SV40 (clona pSV-O-polio). La estrategia general de la construcción fue la inserción de "linkers" (fragmentos pequeños de DNA que poseen una secuencia específica de reconocimiento para determinada enzima de restricción) en el gene que codifica para la proteína 2C. El efecto de la mutación se analizó mediante transfecciones a células de mamífero en cultivo con la mutante construida.

Debido a la relación entre el inhibidor de síntesis de RNA viral Guanidina y la proteína 2C, la HIPOTESIS se basó en la participación de dicha proteína en la replicación viral, esperando encontrar alteraciones específicamente a nivel de este proceso provocadas por la mutación.

Para justificar la hipótesis vale la pena citar que se ha encontrado una fuerte homología en ciertas regiones dentro de la proteína 2C entre varios grupos de Picornavirus. Esto hace pensar que la proteína es esencial para el crecimiento de los virus.

Por otra parte, la proteína 2C se ha encontrado unida fuertemente a membranas celulares y no ha podido ser removida de ellas, aún con concentraciones altas de sal (2M NaCl). Este pèptido viral se encuentra formando parte del "complejo replicativo" asociado

a membranas (Caliquiri y Tamm, 1970; Takegami y cols., 1983a, b). Probablemente el papel de 2C sea mantener unidos a los factores involucrados en el proceso replicativo: la Polimerasa y el RNA viral, así como a la proteína VPg, ("primer" en la iniciación de replicación), ligando estos factores y formando una unidad funcional (Bienz y cols., 1987). Esto se apoya parcialmente en el hecho de que 2C tiene afinidad a la porción amino-terminal de la proteína 3AB (Takegami y cols., op.cit.b) precursor de VPg. Asimismo, 2C posee una secuencia concenso (Gly-X-X-X-X-Gly-Lys-Ser-(Thr)) reportada en proteínas afines a mononucleótidos (lo que le puede dar afinidad por RNA) y con una función en procesos de replicación (Gorbalenya y cols., 1985).

Según el segundo modelo de replicación descrito anteriormente, se sugiere que la función de 2C podría encontrarse en el paso de iniciación de la síntesis de RNA, puesto que la actividad inhibidora de la Guanidina se encuentra en ese punto del proceso (Tershak, 1982).

Con el análisis fenotípico de la mutante se esperaría encontrar deficiencias en el fenómeno de replicación viral. Esto implicaría evidentemente que dicha mutante fuera viable. Sin embargo, la posibilidad de que la alteración en la proteína 2C produjera mutantes letales, no significaría un resultado negativo, puesto que si la proteína 2C es esencial en el proceso de replicación, una mutación podría alterarla de tal manera que el proceso podría verse abatido completamente, lo cual no se contrapone con la hipótesis de un posible papel de la proteína 2C en la síntesis de RNA viral.

Por otra parte, el desarrollo de nuevas mutantes en la proteína 2C, viables o no, podría ser visto como una contribución a los

principios de la Biología Molecular del virus y de la enfermedad que produce, así como un esfuerzo científico para tratar de dominarla.

MATERIALES

a.) MATERIAL BIOLOGICO

CELULAS DE ORIGEN HUMANO: Se utilizó la línea celular HeLa S-3 (derivada de un carcinoma de cérvix uterino de humano) mantenida por cultivo en monocapa. Se empleó también la línea celular 293, derivada de células embrionarias de riñón humano, transformadas con DNA de la región temprana de adenovirus y crecida en monocapa.

SUERO: Se utilizó suero de caballo inactivado (53 C, 30 min.) y filtrado para células HeLa, y suero de ternera en las mismas condiciones para células 293.

BACTERIAS: Las bacterias utilizadas fueron E.coli HB101.

ENZIMAS: La casa comercial proveedora de las enzimas fue New England BioLabs.

b.) MEDIOS DE CULTIVO

PARA LAS CELULAS: Para ambos tipos de células, se utilizó el medio Dulbecco (medio liofilizado, dextrosa, bicarbonato y Hepes), suplementado con suero al 10% y, como antibiótico para prevenir contaminación por bacterias, se empleó solución de penicilina-estreptomicina 1X. El medio se esteriliza por filtración, utilizando membranas millipore de 0.22um.

PARA LAS BACTERIAS: Para el cultivo de bacterias E.coli, se empleó

el medio Luria (Bacto-triptona 10 gr/l, Bacto-extracto de levadura 5 gr/l, cloruro de sodio 5 gr/l, ajustado a pH 7.5), esterilizado por autoclave.

c.) SOLUCIONES Y MEZCLAS

Solución amortiguadora para lavado de células (PBS)

NaCl	137 mM
KCl	3 mM
Na_2HPO_4	16 mM
KH_2PO_4	2 mM

Solución de Penicilina-Estreptomicina (100X)

Penicilina G sódica	$5x10^6$ U
Sulfato de estreptomicina	5 gr
Aforar a	1000 ml
Esterilizar por filtración	

Solución de Tetraciclina

Tetraciclina	1.25 gr
Aforar a	100 ml
con Etanol-agua (50% v/v)	
Esterilizar por filtración	
Almacenar a -20 C en obscuridad	

Solución de Ampicilina

Ampicilina	0.5 gr
Aforar con agua a	100 ml

Esterilizar por filtación

Almacenar a -20°C en obscuridad

Solución de Cloranfenicol

Cloranfenicol	5 gr
Aforar con etanol 100% a	100 ml

Esterilizar por filtración

Almacenar a -20°C en obscuridad

Solución de lisozima

lisozima	1 gr
Aforar a	100 ml

con Tris-HCl (10 mM,pH 7.5)

Congelar inmediatamente con nitrogeno líquido

Almacenar a -20°C

Solución I para extracción de DNA plasmídico

• Glucosa	50 mM
EDTA pH 8	10 mM
Tris-HCl pH 8	25 mM

Solución II para extracción de DNA plasmídico

NaOH	0.2 N
SDS	1%

Solución III para extracción de DNA plasmídico

Acetato de Sodio trihidratado	2d.48 gr
Acido acético glacial	6.89 ml
Aforar con agua a	100 ml

Amortiguador TE 1X

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

Solución de RNAsa A

RNAsa A	20 mg
Aforar con NaCl(150mM) a	20 ml

Ebullición 15 min.

Almacenar a $-20^{o}C$

Mezcla de Cloroformo-alcohol isoamílico

Cloroformo	96 ml
Alcohol isoamílico	4 ml

Amortiguador de columna de Sefarosa para purificación de DNA

NaCl	0.5 M
Tris-HCl pH 7.8	50 mM

EDTA	10 mM

Amortiguador para enzimas de restricción "sal-baja" (LS) 10X

Tris-HCl pH 7.5	0.1 M
$MgCl_2$	0.1 M
EDTA	0.01 M
DTT	0.01 M

Amortiguador para enzimas de restricción "sal-media" (MS) 10X

Tris-HCl pH 7.5	0.1 M
$MgCl_2$	0.1 M
NaCl	0.5 M
EDTA	0.01 M
DTT	0.01 M

Amortiguador para enzimas de restricción "sal-alta" (HS) 10X

Tris-HCl pH 7.5	0.5 M
$MgCl_2$	0.1 M
NaCl	1.0 M
EDTA	10 mM
DTT	10 mM

Amortiguador TBE 10X

Trizma-base	108 gr
Acido bórico	55 gr
EDTA	9.3 gr
Aforar con agua a	1000 ml

Ajustar a pH 8.3

Solución de bromuro de etidio para tinción de geles

Bromuro de etidio	100 mg
Aforar con agua a	100 ml

Amortiguador de muestra para gel de agarosa

Sacarosa	12.5 gr
TBE 10X	12.5 ml
SDS 10%	2.5 ml
Azul de bromofenol	125.0 mg
Xilen-xianol	125.0 mg

Amortiguador para DNA-Polimerasa T4 10X

Tris-HCl pH 7.5	700 mM
$MgCl_2$	100 mM
DTT	50 mM

Amortiguador para ligación 5X (PEG)

Tris-HCl pH 7.6	250 mM
$MgCl_2$	50 mM
Polietilen-glicol(8000)	25%
ATP	5 mM
DTT	5 mM

Amortiguador para ligación 10 X

Tris-HCl pH 8	500 mM
DTT	20 mM

$MgCl_2$	100 mM
ATP	10 mM

Medio de cultivo para células competentes "a"

Bacto-extracto de levadura	5 gr
Bacto-triptona	20 gr
$MgSO_4$	5 gr
Ajustar a pH 7.6 con KOH	
Bacto-agar	14 gr
Aforar con agua a	1000 ml
Esterilizar por autoclave	

Medio de cultivo para células competentes "b"

Medio "a" (sin agar)

Filtrar a traves de filtro de 0.45 um

Solucion Tfb1

Acetato de Potasio	30 mM
KCl	100 mM
$CaCl_2$	10 mM
$MnCl_2$	50 mM
Glicerol	15%

Ajustar a pH 5.8 con ácido ácetico (0.2M)

Esterilizar por filtración

Solución Tfb2

MOPS o PIPES	10 mM
$CaCl_2$	75 mM

KCl	10 mM
Glicerol	15%

Ajustar a pH 6.5 con KOH

Esterilizar por filtración

Solución TS (tris-sacarosa) para minipreparación de plásmido

Tris-HCl pH 7.5	50 mM
Sacarosa	25%

Solución ELT para minipreparación de plásmido

EDTA	100 mM
Lisozima	2 mg/ml
Tritón X100	0.1%

Solución PEG-NaCl para minipreparación de plásmido

PEG 6000	20%
NaCl	1 M

Solución PEG-NaCl para extracción de plásmido para transfección

PEG 8000	13%
NaCl	1.6 M

Amortiguador HEBS para transfección

NaCl	0.14 M
KCl	0.005 M
Na_2HPO_4	0.001 M
Dextrosa	0.1%

Hepes	0.02 M

Ajustar a pH 7.05 con NaOH fresco

Mezcla de Cristal violeta-etanol para teñido de placas

Cristal violeta	1 gr
Etanol	100 ml

d.) COMPOSICION Y PREPARACION DE OTROS MATERIALES

Fenol saturado con Tris

Fundir el fenol (ultrapuro) a 70°C. Añadir hidroxiquinoleína para evitar oxidación. Agregar 0.5 volumen de Tris-HCl 250 mM, pH 7.5 y mezclar fuertemente. Esperar a que las fases se separen. Repetir varias veces hasta que el pH sea neutro.

DNA de esperma de salmón (acarreador para transfección)

Preparar a una concentración de 10 mg/ml. Agitar con calor para disolver. Pasar repetidas veces por una jeringa con aguja. Hervir y almacenar a -20°C (DNA tipo VII D-1632).

Agar para plaqueo

Dulbecco 2X	44 ml
Penicilina-estreptomicina (100X)	1 ml
Suero	5 ml
Bacto-agar 1.8%	50 ml

Mantener a 45°C hasta vaciar encima de las células.

Las soluciones se esterilizaron por autoclave, a 125°C, durante

20 minutos, con una presión de 15 lb/cm^3 y se almacenaron a 4^oC o -20^o C cuando fue necesario.

a.) MAXIPREPARACION DE PLASMIDO PARA CONSTRUCCIONES GENETICAS

La extracción de plásmido para las construcciones genéticas se realizó por el método alcalino (Horowitz y Burke, 1981), seguido de purificación por columna de Sefarosa (Maniatis, op. cit.).

Se crecieron cultivos de bacterias E.coli HB101 transformadas con el plásmido deseado en 500 ml de medio Luria, suplementado con el antibiótico adecuado. Cuando las células alcanzaron una D.O. de 0.6 a 0.8 a una longitud de onda de 550 nm, la replicación del plásmido fue amplificada con Cloranfenicol (170 ug/ml) durante 12 horas.

Las bacterias se centrifugaron a 9000 rpm (rotor GSA, centrifuga Sorvall RC-2B) a 4°C durante 10 min. para empastillarlas. La pastilla se resuspendió en 16 ml de solución I y se dividió en 4 tubos de 30 ml. Se agregó a cada tubo lisozima a una concentración final de 2mg/ml y se incubó durante 10 min. a 4°C. Posteriormente se agregaron 8 ml de solución II, se mezcló por inversión y se dejó 5 min. a 4° C. Se adicionaron 6 ml de solución III y se agitó suavemente. Enseguida se congeló en hielo seco, se descongeló a 37°C y se centrifugó 30 min. a 4° C a 10,000 rpm (Sorvall, SS34). Se tomó el sobrenadante, que contiene el DNA plasmídico, se transfirió a otro tubo y se le adicionó un volumen de isopropanol para precipitar el DNA. Se dejó a temperatura ambiente durante 20 min. y se centrifugó 15 min. a 4°C, a 10,000 rpm (Sorvall, SS34). La pastilla se resuspendió en 2 ml de amortiguador TE 1X y se adicionó RNAsa "A" para tener una concentración final de 25 ug/ml y se incubó 1 hr. a 37°C. Pasado este tiempo se agregó un volumen de fenol (saturado con Tris) y se mezcló

con un vortex. Posteriormente se centrifugó 5 min. a 5,000 rpm (Sorvall, SS34). La fase acuosa se extrajó dos veces con cloroformo-alcohol isoamílico,. Eliminadas las proteínas por el tratamiento fenol-cloroformo, se agregó 0.1 de volumen de acetato de sodio 3M y 2 volumenes de etanol absoluto frío para precipitar el DNA. Enseguida se centrifugó a 10,000 rpm a 4^{o}C (Sorvall, SS34). La pastilla se resuspendió en 1 ml de amortiguador de columna para su posterior purificación por columna de Sefarosa.

b.) PURIFICACION DE PLASMIDO POR COLUMNA DE SEFAROSA

Después de la extracción del plásmido por método alcalino, el DNA se resuspendió en 1 ml de amortiguador de columna. La resina para columna denominada Sefarosa 4B, se lavó 4 veces con el amortiguador y enseguida se resuspendió en el mismo. Se colocó lentamente en la columna (25 cm de largo x 2 cm de diámetro) para permitir el empaque de la Sefarosa sin la formación de burbujas. Se agregaron continuamente 10 ml del amortiguador. Cuando éste fue absorbido completamente por la columna, inmediatamente se depositó el DNA resuspendido y se permitió su absorción. Enseguida, la columna se llenó con amortiguador el cual se fue adicionando continuamente. El volumen que salió de la columna durante 10 min., fue colectado en un solo tubo. Posteriormente, se tomaron alicuotas de 10 ul c/u del fluido que se colectó en 10 tubos eppendorf para correrlas en un gel de agarosa 1% y localizar las fracciones del fluido en donde se encontraba el plásmido. Esas fracciones se mezclaron y se precipitaron con 2.5 volumenes de etanol absoluto frío, centrifugando a 10,000 rpm

a 4 C (Sorvall, SS34) durante 30 min. La pastilla de DNA se lavó 2 veces con etanol al 70% para eliminar el exceso de sales, se secó con vacio y se resuspendió en amortiguador TE 1X. El plásmido obtenido se checó por restricción con diferentes enzimas y se utilizó para las diferentes construcciones de plásmido.

c.) RESTRICCION DE DNA

090986

De manera general, las restricciones de plásmido se realizaron bajo las condiciones especificas (amortiguador, tiempo y temperatura), indicadas por la casa comercial de donde provenían las enzimas. Para el caso de las restricciones parciales, se tomaron aproximadamente 4 ug de DNA y se restringieron con una pequeña cantidad de la enzima adecuada, tomando alícuotas a diferentes tiempos, según el caso, para analizarlas mediante geles de agarosa al 1% y determinar el tiempo necesario para obtener la mayor cantidad del fragmento de DNA requerido.

Cuando se realizaron restricciones dobles simultáneas, se utilizó el amortiguador concentrado (10X) de alta o baja sal que convenía a las dos enzimas, según las especificaciones del proveedor. Cuando las condiciones de amortiguador para las dos enzimas fueron muy diferentes, las dobles restricciones se realizaron por separado, eliminando el amortiguador para la primera enzima, precipitando el DNA con 0.1 de volumen de acetato de sodio 3M, más 2 volúmenes de etanol absoluto, para resuspender en el segundo amortiguador.

Para todos los casos la restricción se verificó, corriendo alícuotas de las muestras en geles de agarosa al 1% para observar el patrón de restricción esperado.

d.) ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Las diferentes muestras de DNA de plásmido se mezclaron con amortiguador de muestra 10X y se corrieron el geles de agarosa de 0.7 a 1%, utilizando cámaras de electroforesis de 7.5x5 cm y de 20x15 cm según el caso. La solución de agarosa se preparó en amortiguador TBE 1X, calentando para que se disolviera. La solución se virtió en la cámara y se esperó hasta que hubo solidificado. La corrida se realizó a 100 volts, utilizando como amortiguador TBE 0.5X. Los geles se tiñeron, agregando durante la corrida 70 ul de solución de bromuro de etidio (1mg/ml). Terminada la corrida se lavaron con agua y se colocaron sobre una lámpara de luz ultravioleta de onda corta, para poder observar las bandas de DNA.

e.) PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSION

Después de la restricción de los plásmidos, las muestras se corrieron en geles 1% agarosa de bajo punto de fusión (en las condiciones ya mencionadas para electroforesis) para la extracción de fragmentos. Estos se localizaron en el gel y las bandas se cortaron con ayuda de un bisturí. Los trozos de gel se colocaron en tubos eppendorf y se fundieron en un baño a 68^{o}C durante 10 min. Enseguida se mezclaron con 4 volúmenes de amortiguador TE 1X y se adicionó un volumen (del vol. final) de fenol-saturado con Tris para eliminar la agarosa. Se agitó vigorosamente con vortex y se centrifugó 15 min. a

la velocidad máxima (centrifuga eppendorf). La fase superior se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo y se adicionó 0.5 volumen de fenol-saturado con Tris y 0.5 volumen de cloroformo, se agitó nuevamente con un vortex y se centrifugó 10 min. Se tomó nuevamente la fase superior, que es la fase acuosa donde se encuentra el DNA y se extrajo dos veces con cloroformo, adicionando para ello un volumen de este último en cada extracción, agitando fuertemente y centrifugando 5 min. Posteriormente, la fase acuosa libre de agarosa, se precipitó agregando 0.1 de volumen de acetato de sodio 3M más 2 volúmenes de etanol absoluto frio. La mezcla se colocó durante 15 min. a -70^{o}C y se centrifugó el mismo tiempo a 4^{o}C. Por último, la pastilla de DNA se lavó 2 veces con etanol al 70% para elimnar exceso de sales, se secó con vacio y se resuspendió en el volumen adecuado de agua.

f.) TRATAMIENTO CON DNA-POLIMERASA T4

2 ug del plásmido se incubaron con la enzima de restricción adecuada durante toda la noche a 37^{o}C. Se corrió una alícuota en gel de agarosa 1% para verificar que todo el DNA había sido cortado. La muestra se colocó en un baño a 68^{o}C durante 10 min. para inactivar la enzima y el DNA se precipitó adicionando 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M, más 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se colocó 15 min. a -70 C y se centrifugó el mismo tiempo a 4^{o}C (centrífuga eppendorff). La pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en agua.

Se tomaron 15 ul (aproximadamente 750 ng) de DNA, se agregaron 3 ul de amortiguador 10X para la DNA Polimerasa-T4, 4 ul de dNTPs (1 ul c/u, 50 mM) o agua según el caso, y 3 ul (3 unidades) de la enzima,

más 5 ul de agua para completar a 30 ul. Se dejó incubando 2 horas a 37°C. Pasado este tiempo la enzima se inactivó, colocando el tubo en un baño a 68°C durante 10 min. El DNA se precipitó con acetato de sodio-etanol, como se describió anteriormente. La pastilla, lavada con etanol al 70% frío, se resuspendió en 10 ul de agua.

g.) INSERCION DE LINKERS

Para el caso de la inserción de "linkers" Xho I en el plásmido pV1-120, después del tratamiento con la enzima DNA Polimerasa T4, se tomaron 10 ul de DNA (aproximadamente 400 ng),se adicionaron 4 ul del amortiguador de ligasa 5X-PEG, se agregaron los "linkers" fosforilados: 1.5 ul (aproximadamente 75 ng) para una relación vector:linker de 1:50. Se colocó la mezcla en presencia de ligasa concentrada (1ul , equivalente a 400U), ya que son extremos parejos. Por último se adicionó agua (3.5 ul) para tener un volumen final de 20 ul. La ligación se dejo a temperatura ambiente toda la noche.

Para eliminar el exceso de "linkers", posteriormente se realizó una superdigestión del DNA ligado, con la enzima Xho I. Se tomaron 11 ul de la mezcla de ligación (aproximadamente 260 ng) y se colocó en un baño a 68°C durante 10 min. para inactivar la ligasa. Se adicionaron 1.7 ul de amortiguador para Xho I y 0.5 ul de NaCl 4M, para ajustar a las condiciones de sal de la enzima, más 3 ul (30 Unidades) de Xho I y 13.5 ul de agua para un volumen final de 30 ul. Se dejó la restricción a 37°C toda la noche.

Por último, se llevó a cabo una segunda ligación. La enzima de la mezcla anterior se inactivó de la manera descrita, el DNA se

precipitó con acetato de sodio-etanol (en este paso se eliminaron los linkers) y la pastilla se resuspendió en 10 ul de agua. La ligación se realizó como la anterior, sólo que con menor cantidad de ligasa.

En cada uno de los diferentes pasos del protocolo se tomó una alícuota de DNA para correr en geles de agarosa.

h.) LIGACION DE DNA

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo con la enzima DNA ligasa de T4. La cantidad de la enzima requerida y el tiempo de la reacción depende del tipo de fragmentos de DNA que se pretendan ligar. Para el caso de extremos parejos se utilizó la enzima concentrada, alrededor de 400 U, y la reacción se dejó toda la noche a temperatura ambiente o a 16^{o}C. Cuando se ligaron extremos cohesivos se usaron 40 Unidades de ligasa a 16^{o}C, al menos durante 4 horas. La reacción se realizó en un volumen de 20 ul con aproximadamente 200 ng de DNA.

i.) PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES

Las células E.coli HB101 para transformación, se hacen competentes y se conservan a -70^{o}C en nitrógeno líquido, hasta el momento de su uso.

Se tomaron células HB101 y se sembraron en una placa de medio de cultivo "a". La placa se incubó a 37^{o}C toda la noche. Se tomó una colonia grande y se sembró en 5 ml de medio "b" en un matraz Erlenmeyer de 125 ml para tener suficiente aereación. El cultivo se creció a 37^{o}C en agitación hasta alcanzar una D.O. a 550 nm de 0.3 (aproximadamente 2 hrs.). El cultivo se vació en un Erlnemeyer de un

litro conteniendo 100 ml de medio "b" y se dejó a 37°C en agitación hasta alcanzar una D.O. a 550 nm de 0.48 (aproximadamente después de 2 ó 3 hrs.). El cultivo se dejó 5 min. en hielo y se centrifugó a 10,000 rpm, a 4° C durante 5 min. (Sorvall, SS34) para empastillar las bacterias. Posteriormente, se resuspendieron en 40 ml de solución Tfb1 frío para lavarlas. Se dejaron 5 min. en hielo y se centrifugaron nuevamente a 6,000 rpm, 5 min. a 4 C (Sorvall, SS34). Enseguida se resuspendieron en 4 ml de Tfb2 frío, se colocaron 15 min. en hielo y se repartieron en alícuotas de 300 ul en tubos eppendorf para ser congelados en hielo seco. Por último se pasaron a nitrógeno líquido para su conservación.

j.) TRANSFORMACION

Las células HB101 competentes en alícuotas de 300 ul, se sacaron del nitrógeno líquido y se descongelaron en hielo (aproximadamente 10 min.). Se agregaron 30 ul de B-mercaptoetanol 250 mM y se dejaron 10 min. en hielo. Durante este tiempo se enfriaron tubos eppendorf y enseguida se tomaron 50 ul de células competentes, se colocaron en los tubos frios y se agregaron 1 ó 2 ul de DNA (de 1 a 20 ng) para cada transformación. La mezcla se dejó 30 min. en hielo para la penetración del DNA. Pasado este tiempo se dió un choque térmico a 42°C, durante 90 segundos, más 2 min. en hielo. Por último, se agregaron 200 ul de medio "b" y se dejó 1 hr a 37°C en agitación, para la recuperación de las células y la expresión del plásmido. Finalmente, ls mezcla se extendió con espátula de vidrio en cajas Petri con medio selectivo (Luria-ampicilina o Luria-tetraciclina) para dejarlas toda la noche a 37°C para la aparición de las bacterias transformadas.

k.) MINIPREPARACION DE PLASMIDOS

Este método se utiliza generalmente para la selección de colonias candidatos por la resistencia a un antibiótico determinado, según el caso, después de una transformación. Las colonias se sembraron por separado en 10 ó 5 ml de medio selectivo Luria y se dejaron creciendo toda la noche a 37^{o}C. Se centrifugaron a 6000 rpm (Sorvall, SS34) durante 5 min. La pastilla se resuspendió en 200 ul de solución TS con vortex y se pasó a tubos eppendorf. Enseguida se agregaron 200 ul de solución ELT y se agitó con vortex suavemente. Después de dejar 5 min. a temperatura ambiente, el tubo se colocó en un baño a 70^{o}C. Pasados 15 min. en el baño, el tubo se centrifugó el mismo tiempo a la máxima velocidad en centrífuga eppendorf. Se tomó el sobrenadante y se adicionó un volumen de solución PEG-NaCl para precipitar y se mezcló por inversión. Después de 20 min. de incubación a temperatura ambiente se centrifugó durante 3 min. a la máxima velocidad (centrífuga eppendorf). Se eliminó el sobrenadante y la pastilla de DNA se resuspendió en 30 ul de amortiguador TE 1X. Como el RNA de la muestra no es eliminado mediante este método , se adicionó RNAsa (25ug/ml) y se incubó durante 10 min. antes de correr la muestra en el gel después de terminada la restricción con las enzimas adecuadas para la selección.

1.) EXTRACCION DE PLASMIDO PARA TRANSFECCION

Para realizar transfecciones, se requieren grandes cantidades de

DNA y además, que éste se encuentre completamente libre de RNA y proteínas, para obtener mayor eficiencia en el ensayo.

Se realizó la extracción del plásmido por el método de lisado alcalino (Horowitz y Burke, 1981) ya descrito anteriormente en el inciso (a).

El equivalente de 100 ml de cultivo de bacterias se llevó a 2 ml con amortiguador TE 1X en tubos de 15 ó 30 ml. Se colocó de 10 a 20 segundos a 90°C y se adicionaron 2 ml de Cloruro de Litio 5M frío, para precipitar el RNA. Se mantuvo 5 min. en hielo y enseguida se centrifugó durante 10 min. a 8,000 rpm a 4°C (Sorvall, SS34). Después de la centrifugación, el sobrenadante fue transferido a otro tubo y se agregaron 2.5 volumenes de etanol absoluto frío, para precipitar el DNA. Enseguida se centrifugó 15 min. a 8,000 rpm a 4° C (Sorvall, SS3d). La pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70% frío para eliminar exceso de sales, se secó con vacio y se resuspendió en 0.5 ml de amortiguador TE 1X. El DNA resuspendido de esta manera se transfirió a un tubo eppendorf y se adicionó RNAsa (40ug/ml) para eliminar los residuos de RNA. Se colocó en un baño a 37°C. Después de 15 min., se agregaron 0.5 ml de solución de PEG-NaCl y se centrifugó durante 15 min. a 4°C (centrifuga eppendorf, máxima velocidad). Se retiró el sobrenadante y la pastilla libre de RNA se resuspendió en 150 ul de amortiguador TE (con vortex). Se adicionó un volumen de la mezcla cloroformo-alcohol isoamílico, se agitó vigorosamente con vortex y se centrifugó 5 min. a temperatura ambiente en centrifuga eppendorf. Se tomó la parte superior y de la misma manera se agregó un volumen de fenol saturado con Tris, se agitó fuertemente y se centrifugó. La fase superior se lavó nuevamente con cloroformo-alcohol isoamílico, se centrifugó y la fase acuosa, que contiene el DNA se

precipitó agregando 0.1 de volumen de acetato de sodio 3M más 2.5 volumenes de etanol absoluto frío y centrifugando 30 min. a 4°C. Se lavó con etanol al 70% 2 veces y se secó con vacio. Por último se resuspendió en 100 ul de agua.

m.) TRANSFECCION DE DNA A CELULAS 293

La transfección de DNA a células 293 se realizó por el método del Fosfato de Calcio. Las células se sembraron 1 ó 2 días antes del ensayo en cajas p60, para que en ese momento se encontraran entre 70-80% de confluencia. Se tomaron 10 ug del plásmido y se coprecipitaron en un tubo eppendorf con la misma cantidad de DNA de esperma de salmón como acarreador, agregando 0.1 de volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volumenes de etanol absoluto. Se centrifugó 10 min. a 4°C (centrífuga eppendorf) y la pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70%. El etanol se eliminó por aspiración al vacio y se secó ligeramente la pastilla en condiciones de esterilidad. El DNA se resuspendió en 1 ml de amortiguador HEBS, agitando vigorosamente con vortex. Inmediatamente se adicionaron lentamente 61 ul de Cloruro de Calcio 2M y se mezcló suavemente. La mezcla se dejó 30 min. a temperatura ambiente. Durante este tiempo se forma un precipitado blanco muy fino de Fosfato de Calcio-DNA. La formación de precipitados grandes indican un pH incorrecto del amortiguador HEBS o de una agitación excesiva.

Pasados los 30 min., se retiró el medio de las cajas con aspiración y se adicionó lentamente la mezcla de transfección (500 ul para cada caja p60). Las cajas se dejaron reposando a temperatura ambiente durante 30 min., moviendo ligeramente a los 15 min. para

evitar el secado de la monocapa. Finalmente se agregaron, sin eliminar la mezcla de transfección, 5 ml de medio fresco con 5% de suero de ternera y se incubaron durante 4 hrs. a 37^{o} C. Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio por aspiración y se agregaron 5 ml de agar de plaqueo. Las cajas se dejaron a temperatura ambiente hasta que el medio hubo solidificado y se incubaron a 37^{o}C hasta que aparecieron las placas de lisis (de 3 a 4 días para el DNAc silvestre). Después de este tiempo las placas se tiñeron con cristal violeta-etanol como se indica más adelante.

n.) TITULACION DE VIRUS PRODUCTO DE LA TRANSFECCION

Después de realizada la transfección de DNA a células 293 y transcurridas las 4 hrs. de recuperación, en algunos casos, se adicionó medio líquido 5% suero (en concentraciones más altas se inhibe la producción de virus) en sustitución del agar de plaqueo. Las cajas se dejaron incubando a 37^{o}C hasta que las células se lisaron completamente. Cada tercer día se adicionó 1 ml de medio fresco. Las células lisadas se resuspendieron en el medio, se transfirieron a tubos cónicos y se llevaron a un volumen de 5 ml. Se congelaron y descongelaron 3 veces y se centrifugaron 5 min. a 3000 rpm (centrifuga Internacional PR600) para eliminar restos celulares. Por último se hicieron diluciones del sobrenadante en medio de cultivo con 5% de suero.

Por otra parte, células HeLa en monocapa, crecidas hasta confluencia en cajas p60, fueron eliminadas del medio de cultivo y lavadas 2 veces con PBS. Posteriormente, se agregaron 500 ul de las diluciones preparadas. Las cajas se movieron lentamente para que la

mezcla se extendiera por la superficie de la caja y se dejaron durante 1 hr a temperatura ambiente para permitir la adsorción del virus, moviendo cada 15 min. Pasado este tiempo, el medio de dilución fue eliminado por aspiración y las cajas se lavaron 2 veces con amortiguador PBS. Inmediatamente se agregaron 5 ml de agar de plaqueo y se introdujeron a la incubadora a 37°C después de la solidificación del agar. Pasados tres días las placas se tiñeron con cristal violeta-etanol.

ñ.) TINCION DE PLACAS CON CRISTAL VIOLETA-ETANOL

90986

Después de la incubación de las células (transfectadas o infectadas) a 37°C por varios días (dependiendo del caso), se tomaron las cajas y se les adicionaron 2 ml de TCA al 10% para fijar las placas de lisis. Se dejaron 10 min. a temperatura ambiente. El agar fue eliminado cuidadosamente junto con el TCA, mediante una espátula e inmediatamente se agregaron 2 ml de la solución de cristal violeta-etanol para teñir las placas. Nuevamente se dejaron 10 min. a temperatura ambiente y finalmente se lavaron con agua, se escurrieron y se contaron las placas.

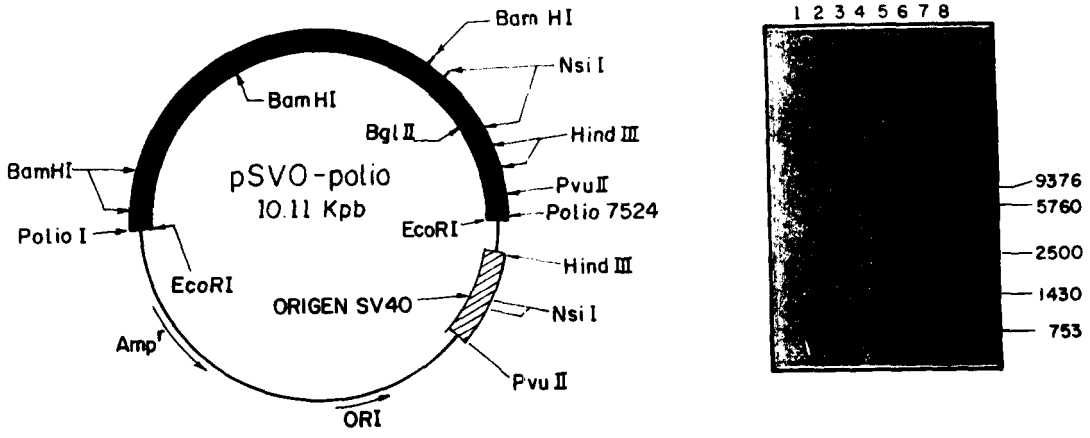
a.) INSERCION DE "LINKERS" EN EL PLASMIDO pVI-120.

Con la finalidad de estudiar la función de la proteína 2C de Poliovirus, se realizaron experimentos de mutagênesis dirigida mediante inserción de "linkers" sobre el DNAc del virus, en la región que codifica para la proteína 2C. Los "linkers" son pequeños fragmentos de DNA que van de 6 a 12 pb y tienen un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción única.

El DNAc de Poliovirus se encuentra clonado en el plásmido pSV-O-polio (ver Apêndice). Las figuras 4 y 5 muestran el patrón de restricción del plásmido y del DNAc de poliovirus. Como se puede observar, existen varios sitios de restricción relativamente cercanos para las enzimas que cortan dentro de la región de la proteína 2C, como es el caso de NsiI, BamHI, BalI, XbaI y DraIII y para otras enzimas que no se muestran en la figura. Estos sitios de restricción, dificultan la inserción de "linkers" directamente en el plásmido pSV-O-polio.

En este sentido, como un primer paso en la construcción de la mutante, la inserción se realizó directamente sobre el plásmido pVI-120 (ver Apêndice y Figura 6). Este plásmido es una subclona de polio que contiene toda la región que codifica para 2C, clonada en el sitio PstI del plásmido pBR322 (Van der Werf y cols., 1981). La ventaja de utilizar este plásmido es que presenta un único sitio de restricción para la enzima NsiI (Figura 6).

PATRON DE RESTRICCION DEL PLASMIDO
pSVO - polio



1) pSV-O-polio
2) pSV-O-polio/NsiI (total)
3) pSV-O-polio/Nsi (parcial)
4) pSV-O-polio/BglII
5) pSV-O-polio/EcoRI
6) pSV-O-polio/Hind III
7) pSV-O-polio/PvuII
8) pSV-O-polio/Bam HI

FIGURA 4.- Patrón de restricción del plásmido pSV-O-Polio. El DNAc de Polio se encuentra clonado en el plásmido pSV-O-Polio el cual contiene la resistencia a ampicilina y el origen de pBR322, así como el origen de replicación y el promotor de SV40 para su expresión en eucariontes. El plásmido se checó por restricción con las enzimas indicadas. Los números indican el tamaño de los fragmentos en número de bases.

MAPA DE RESTRICCION DEL DNA_c DE POLIVIRUS

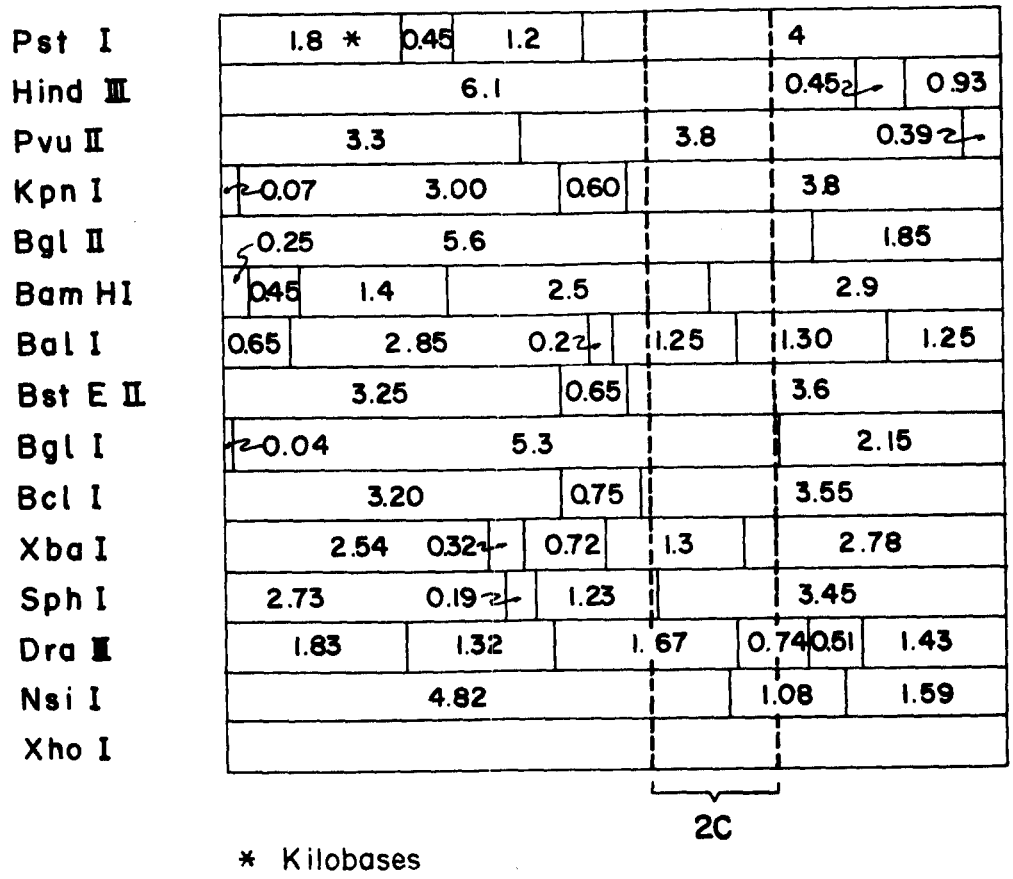


FIGURA 5.- Mapa de restricción del DNAc de Poliovirus. Los números indican el tamaño en kilobases de los diferentes fragmentos obtenidos después de la restricción. Las líneas punteadas enmarcan la región de la proteína 2C. Se observan 2 sitios únicos de restricción para la enzima NsiI y ausencia de sitios para XhoI (modificado de Van der Werf y cols., 1981).

PLASMIDO pV1-120

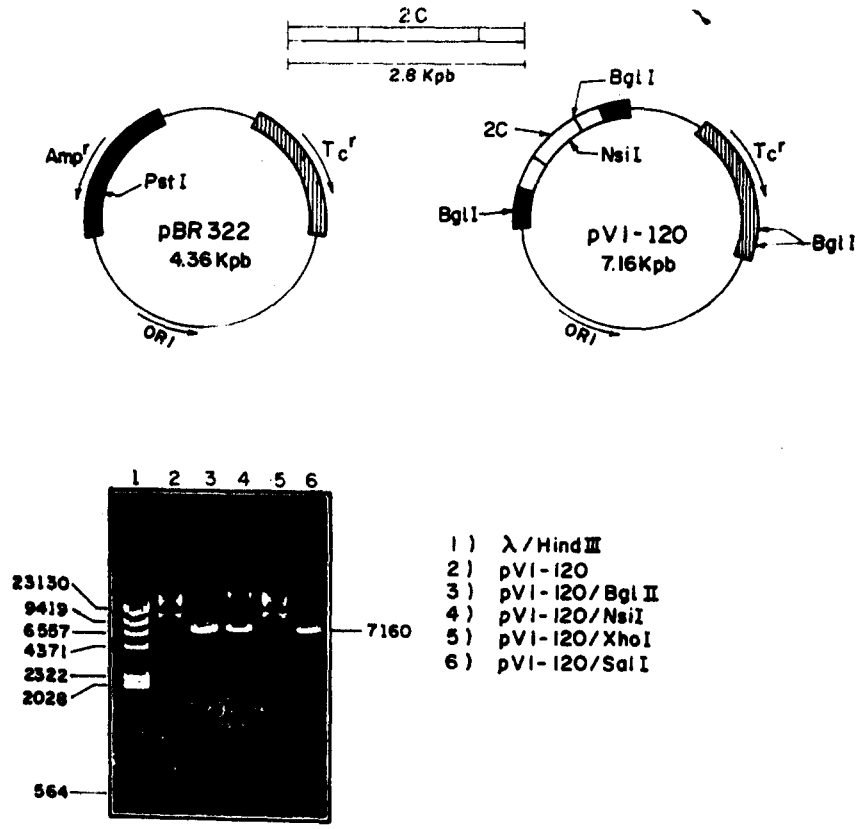


FIGURA 6.- Patrón de restricción del plásmido pV1-120. Este plásmido es una subclona de Polio que contiene un fragmento de 2.8 kb clonado en el sitio PstI de pBR322 y que contiene asimismo la región para la proteína 2C. El plásmido se checó por restricción con las enzimas indicadas. Se utilizó como marcador al fago lambda restringido con HindIII. Los números a los lados del gel indican el tamaño de los fragmentos en número de bases.

El plásmido pVI-120 fue completamente digerido con NsiI y las moléculas lineales de DNA fueron aisladas. La restricción con esta enzima produce extremos de 4 pb 3' libres en el DNA (Figura 7). Los "linkers" tienen extremos parejos que evidentemente requieren del mismo tipo de extremos para poder unirse a otras moléculas de DNA.

Una vez llevada a cabo la restricción de pVI-120 con NsiI, fue necesario "emparejar" los extremos 3' de la molécula, mediante la enzima DNA Polimerasa del fago T4. Esta enzima tiene tanto actividad de polimerasa en dirección 5' a 3' en presencia de nucleótidos trifosfatados, así como actividad de exonucleasa en dirección 3' a 5' en presencia de nucleótidos trifosfatados (Maniatis y cols., 1982).

Como un control de la DNA Polimerasa T4, paralelamente al ensayo con pVI-120, se trabajó con un plásmido denominado pGEM-4 (ver Apéndice y Figura 8). Este plásmido tiene una región "polilinker" con sitios de restricción únicos y cercanos entre sí para las enzimas KpnI, EcoRI y BamHI. La restricción con KpnI produce, al igual que la enzima NsiI, extremos 3' libres. Por tal motivo, PGEM-4 se digirió completamente con KpnI, se aislaron las moléculas lineales y se trataron con la DNA polimerasa T4, de la misma manera que se trató el plásmido pVI-120 linearizado con NsiI. El ensayó se realizó en ausencia y en presencia de nucleótidos trifosfatados. Como era de esperarse, en la Figura 9 se observa que en las mismas condiciones, pero en ausencia de dNTPs, el DNA plasmídico tratado con DNA Polimerasa T4 migra más rapido en un gel nativo de agarosa, que el DNA tratado con la misma enzima, pero en presencia de los nucleótidos. Esto significa que la DNA Polimerasa T4 está actuando como exonucleasa, digiriendo el DNA cuando no tiene dNTPs, por lo que el

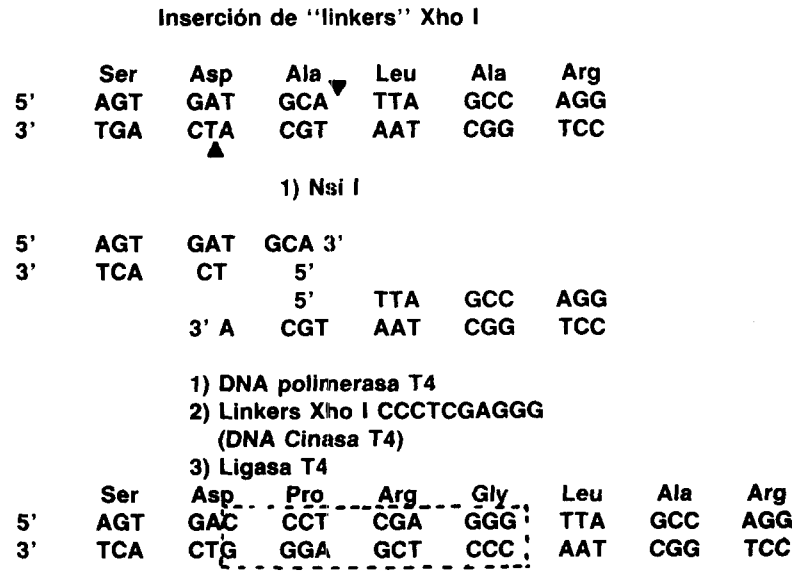
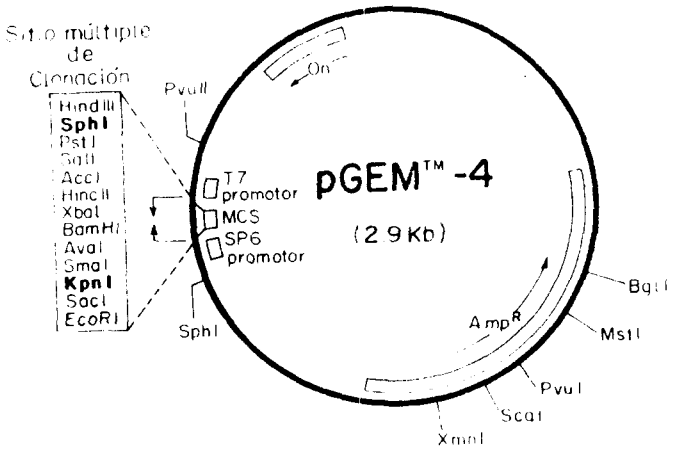
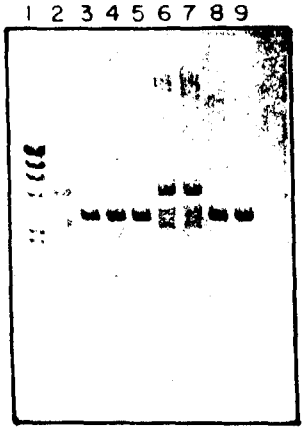


FIGURA 7.- Inserción de "linkers" en el sitio NsiI de la región de la proteína 2C. En la secuencia de bases de la parte superior se enmarca con triangulos el sitio de reconocimiento y corte de la enzima NsiI. En la parte central se muestran los extremos 3' libres después de la restricción. El plásmido linearizado con NsiI se trató con DNA Pol-T4 para "recortar" los extremos 3' libres, se adicionaron los "linkers" XhoI fosforilados y se llevó a cabo la reacción para ligar. Se esquematiza en la parte inferior, la inserción de los 3 aminoácidos en la proteina 2C. La secuencia de tripletes se conserva a lo largo de la poliproteína.





3) Ligación
4) Transformación



1) λ - Hind III
2) pGEM - 4
3) pGEM - 4 / KpnI
4) pGEM - 4 / EcoRI
5) pGEM - 4 / BamHI
6) pGEM - 4 - K
7) pGEM - 4 - K / KpnI
8) pGEM - 4 - K / EcoRI
9) pGEM - 4 - K / BamHI

FIGURA 8.- Patrón de restricción de pGEM-4. Ensayo KpnI-DNA Polimerasa-T4. Para probar la actividad de exonucleasa de la enzima DNA-Pol-T4, el plásmido pGEM-4 se linearizó con KpnI, enzima que deja extremos 3' libres. Posteriormente se trató con la DNA-Pol-T4 para "recortar" los extremos. Después de la recircularización del plásmido con la enzima ligasa, se transformaron células E.coli HB101. Se extrajó plásmido de las transformantes y se analizó por restricción con las enzimas indicadas. Se utilizó como marcador el fago lambda cortado con HindIII.

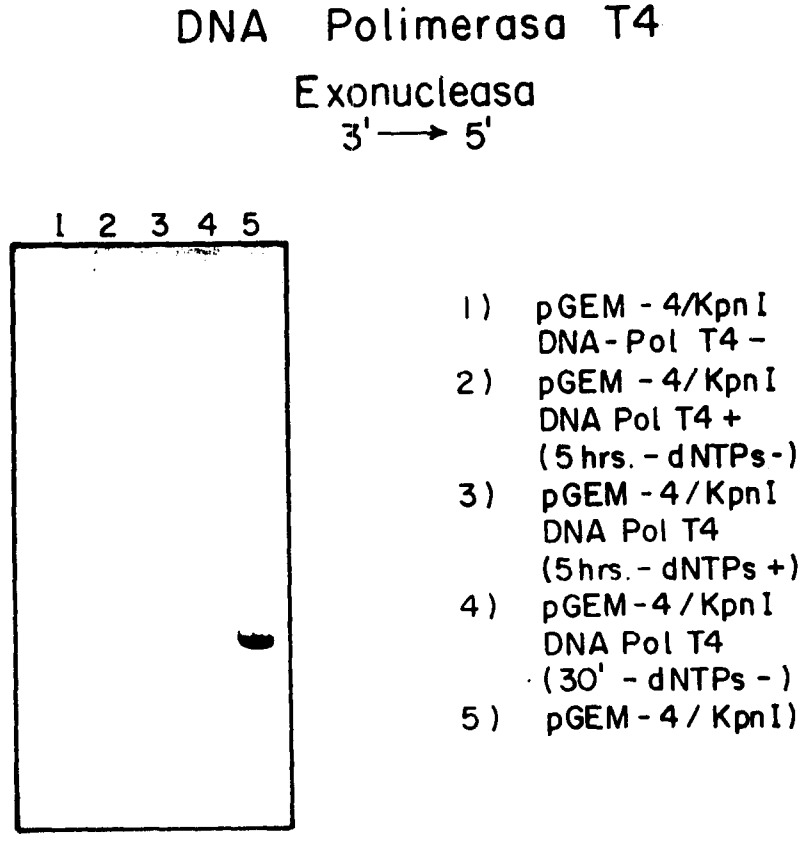


FIGURA 9.- Actividad de la DNA-Pol-T4. El plásmido pGEM-4 se restringió con KpnI. Enseguida se trató con la DNA-Pol-T4 en ausencia (carril 2 y 4) y en presencia de dNTPs (carril 1 y 3). A diferentes tiempos después de la adición de la enzima, se tomaron alicuotas y se analizaron en electroforesis en geles de agarosa al 0.7%.

DNA tiene una velocidad de migración mayor que en presencia de los mismos. Actúa también como exonucleasa sobre los extremos 3' libres, pero solamente hasta encontrar una doble cadena en donde la actividad de exonucleasa se inhibe por la actividad de polimerasa. El plásmido fue posteriormente recircularizado mediante la enzima DNA-ligasa y se digirió con KpnI, EcoRI y BamHI. La fotografía del gel de la figura 8 muestra el patrón de restricción de pGEM-4 con estas enzimas, antes y después del tratamiento con la DNA Pol-T4. El sitio de restricción KpnI se encuentra flanqueado a unas cuantas pares de bases por los sitios Eco RI y Bam HI de manera que, después del tratamiento con la DNA Pol-T4 y la recircularización del plásmido, el sitio KpnI desaparece (Figura 8-7) y los sitios EcoRI y BamHI (Figura 8-8 y 8-9) permanecen intactos. Estos resultados sugieren que la DNA Pol-T4 no digiere al DNA más allá del extremo de cadena sencilla, asegurando la integridad del DNA.

Suponiendo que los mismos resultados se obtendrían con pVI-120, después de la restricción con NsiI y el aislamiento de las moléculas lineales, se realizó el ensayo con la DNA Pol-T4 en presencia de dNTPs. Enseguida (ver Materiales y Métodos) se adicionaron "linkers" XhoI de 10 pb (CCCTCGAGGG) previamente fosforilados, más la enzima DNA ligasa. Es importante mencionar que la selección de este tipo de "linkers" se basó en la ausencia de sitios de reconocimiento para XhoI en pVI-120. En cuanto al número de pares de bases, en la figura 7 se observa que la inserción de un fragmento de 10 pares de bases no altera el orden total de nucleótidos en el DNA, la secuencia de tripletes se mantiene constante, lo que en consecuencia da lugar a la integridad de la estructura primaria de todas las proteínas del virus,

090986

a excepción de la proteína 2C. La inserción de "linkers" XhoI en ese sitio daría como resultado la inserción de tres aminoácidos nuevos en la proteína 2C: Pro, Arg, y Gly (Figura 7) y la eliminación del aminoácido Ala, como consecuencia de la digestión con la DNA Pol-T4.

Posteriormente, la molécula resultante se digirió exhaustivamente con la enzima Xho I para eliminar el exceso de "linkers" y asegurar la inserción de solamente un fragmento de 10 pb. en seguida, se eliminó de la mezcla el exceso de "linkers" liberados por la digestión y el plásmido se recircularizó con DNA ligasa. Con las distintas mezclas de ligación se ralizaron transformaciones en células E.coli HB101 por el método de Cloruro de Calcio (ver Materiales y métodos). La tabla 1 muestra los resultados de la transformación. De manera general se puede observar que los números de la transformación de diferentes mezclas de DNA ligado se van reduciendo paso a paso según el caso. Primeramente el número de transformantes con ligasa después de la restricción de pV1-120 con NsiI (tabla 1-2) disminuye considerablemente con respecto a la transformación con el plásmido circular. Asimismo, después del tratamiento con la DNA Pol-T4 hay una reducción de alrededor del 50% (tabla 1-3), reducción que se ve incrementada después de adicionar los "linkers" (tabla 1-4). Esta reducción en los números de la transformación se puede explicar primeramente con base en que el proceso de ligación nunca es eficiente en un 100% (Maniatis, op. cit.). Además el ligar extremos "parejos" es menos eficiente que hacerlo con extremos cohesivos, aproximadamente en un 50% (Maniatis, op. cit.). En presencia de "linkers", la actividad de la ligasa se reparte incluso en la ligación de "linkers" entre si, lo cual hace todavía menos eficiente la ligación del "linker" para ser

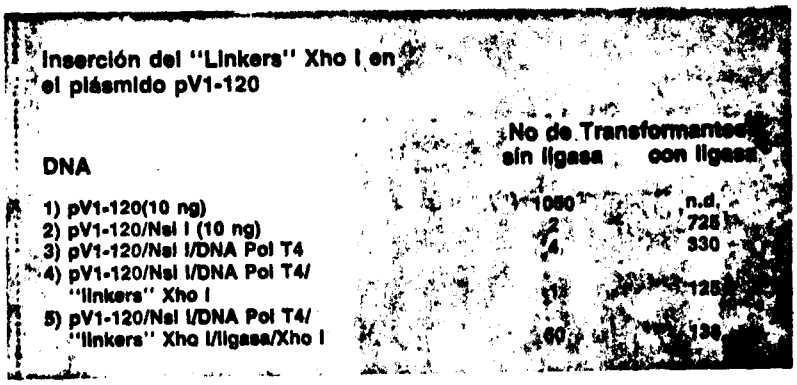
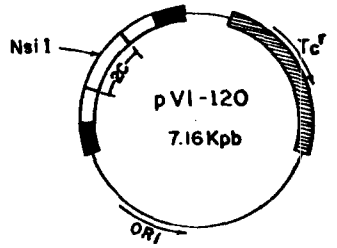


TABLA 1.- Números de transformación. Inserción de "linkers" XhoI en el plasmido pV1-120. Se muestran los números de transformantes con el DNA de los diferentes pasos en la construcción de la mutante en 2C (pV1-120-M1). El ensayo se realizó en células E.coli HB101. Después de la transformación, los 50 ul de células se extendieron con espátula de tubo de vidrio en cajas Petri con Luria-Tetraciclina. Los valores representan los promedios de duplicados.

INSERCION DE "LINKERS" Xho I
EN pVI-120



1) Restricción NsiI
2) T4 DNA Polimerasa
3) Linkers XhoI
(CCCTCGAGGG)
4) Ligasa T4
5) Transformación
6) Selección de candidatos

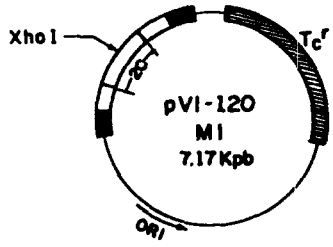


FIGURA 10.- Inserción de "linkers" XhoI en pVI-120. Este plásmido, que contiene a la región que codifica para la proteína 2C, se restringió completamente con NsiI. Posteriormente se trató con la enzima DNA-Pol-T4 para "emparejar" los extremos. Enseguida se adicionaron los "linkers" XhoI de 10 pb en presencia de ligasa T4. Después de la reacción para ligar se realizó una restricción exhaustiva con XhoI, se eliminaron los "linkers" libres y se recircularizó nuevamente con ligasa para después transformar células E.coli HB101, y hacer la selección de candidatos.

insertado en el vector. Por último, el número de transformantes después de la digestión exhaustiva con XhoI, en ausencia de ligasa (tabla 1-5), indica que aproximadamente el 50% de las tansformantes tienen el inserto. Los plásmidos de las colonias de E.coli HB101 resistentes a tetraciclina fueron extraídos por preparaciones rápidas. Los que tenían el "linker" insertado fueron seleccionados en base a una doble restricción. Se utilizaron las enzimas SalI, para la cual hay un único sitio en pV1-120 (Figura 6) y XhoI que indica la inserción del fragmento, esto es, el "linker" XhoI. La Figura 11 muestra los diferentes patrones de restricción de algunas de las transformantes analizadas. Se observa en algunos casos dos bandas de DNA: una de 4780 pb y otra de 2383, lo que indica la presencia de los dos sitios de restricción en la posición esperada (ver Figura 6). En la figura 12, se observa en un gel de agarosa la diferencia en el patrón de restricción entre pV1-120 y el plásmido con el inserto, denominado pV1-120-M1 (ver Apéndice 1). Cuando se digiere pV1-120 con NsiI o SalI el plásmido se linealiza dando una sola banda (Figura 12-6, 3). Lo mismo ocurre cuando lo digerimos con SalI y XhoI a la vez, indicando la ausencia de sitio XhoI (Figura 12-5). Por el contrario, en el carril 9 se observan las dos bandas esperadas producto de la doble restricción con SalI y XhoI en pV1-120-M1. Asimismo la restricción con NsiI no corta al plásmido, ya que después del tratamiento con la DNA Pol-T4 y la inserción del "linker", este sitio se ha perdido.

b.) CLONACION DE LA SECUENCIA 2C DE pV1-120-M1 EN pSV-O-POLIO.

SELECCION DE CANDIDATOS DEL PLASMIDO pVI - 120 - MI



Restricción de candidatos pVI - 120 MI con Sal I - Xho I

FIGURA 11.- Selección de candidatos de pV1-120-M1. Después de la transformación, los candidatos del plásmido pV1-120-M1, se analizaron mediante restricción simultánea con las enzimas SalI y XhoI. las muestras se corrieron en un gel de agarosa 0.7%. Los candidatos positivos (carriles 2,4,6 y 8) presentan un fragmento de 4780 pb y otro de 2383 pb.

PATRON DE RESTRICCION DE pVI-120 y pVI-120-MI

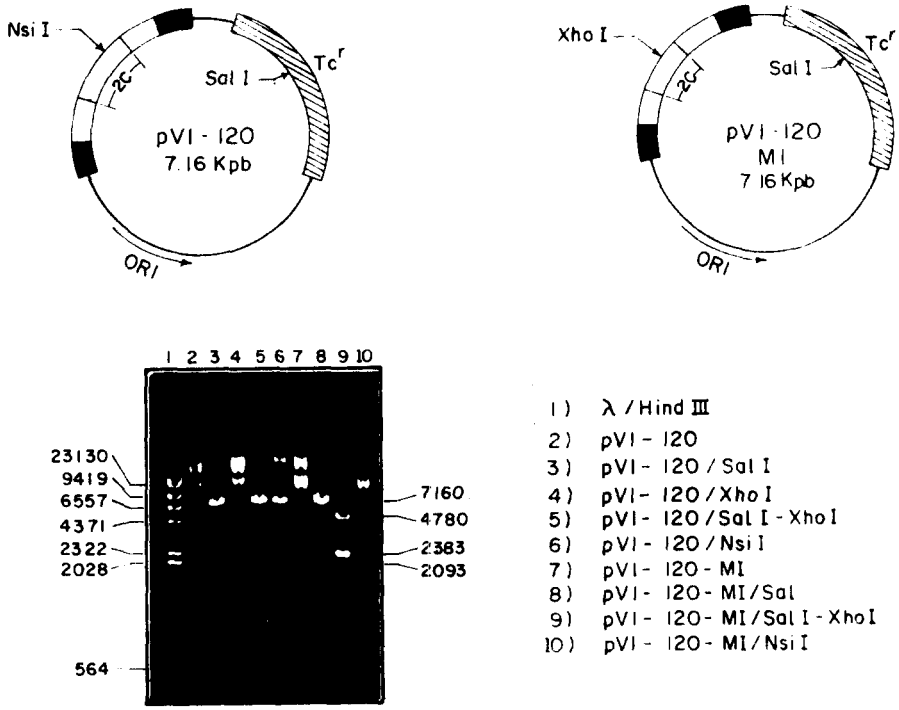


FIGURA 12.-Patrón de restricción de pVI-120 y pVI-120-MI. Los candidatos seleccionados para pVI-120-MI, se checaron mediante restricción con diferentes enzimas. Los fragmentos obtenidos se compararon con el patrón de restricción del plásmido original pVI-120, en un gel de agarosa 0.7%. El marcador utilizado fue el fago lambda cortado con HindIII. Los números a los lados del gel señalan el tamaño de los fragmentos en pb.

El siguiente paso en la construcción de la mutante fue la clonación de la región que codifica para la proteína 2C del plásmido pVI-120-M1 en pSV-O-polio (ver Apéndice), con la finalidad de tener en un plásmido el DNAc de Poliovirus completo, mutagenizado en la región que codifica para la proteína 2C.

La Figura 13 muestra la estrategia seguida para la construcción del plásmido pSV-O-polio-M3 (ver Apéndice), el cual lleva un linker de 10 pb insertado en la posición 4826 del DNAc de poliovirus.

La región para la proteína 2C se encuentra flanqueada por un sitio de restricción BglII y un sitio KpnI. El fragmento de 1950 pb que contiene a la región 2C, fue purificado a partir de un gel de bajo punto de fusión (ver Materiales y Métodos). Paralelamente, el plásmido pSV-O-polio fue digerido con las mismas enzimas. Restricción total con BglII y restricción parcial con KpnI, para purificar el fragmento de 8170 pb que contiene el resto del DNAc del genoma de Polio.

Posteriormente el vector de 8170 pb se unió al fragmento de 1950 pb en presencia de la enzima DNA ligasa. Esta mezcla para ligar se utilizó para transformar células HB101. Los números de la transformación se muestran en la tabla 2. Se puede observar que el ensayo de transformación con el vector digerido con BglII y KpnI adicionado con la enzima DNA ligasa y sin fragmento (tabla 2-2) produce transformantes que no se esperaban obtener, ya que los extremos producto de la doble restricción con BglII y KpnI no son cohesivos. Sin embargo es posible que la presencia de transformantes en este ensayo se deba a una posible contaminación con pSV-O-polio linearizado en la banda de 8170 pb que se purificó del gel de bajo

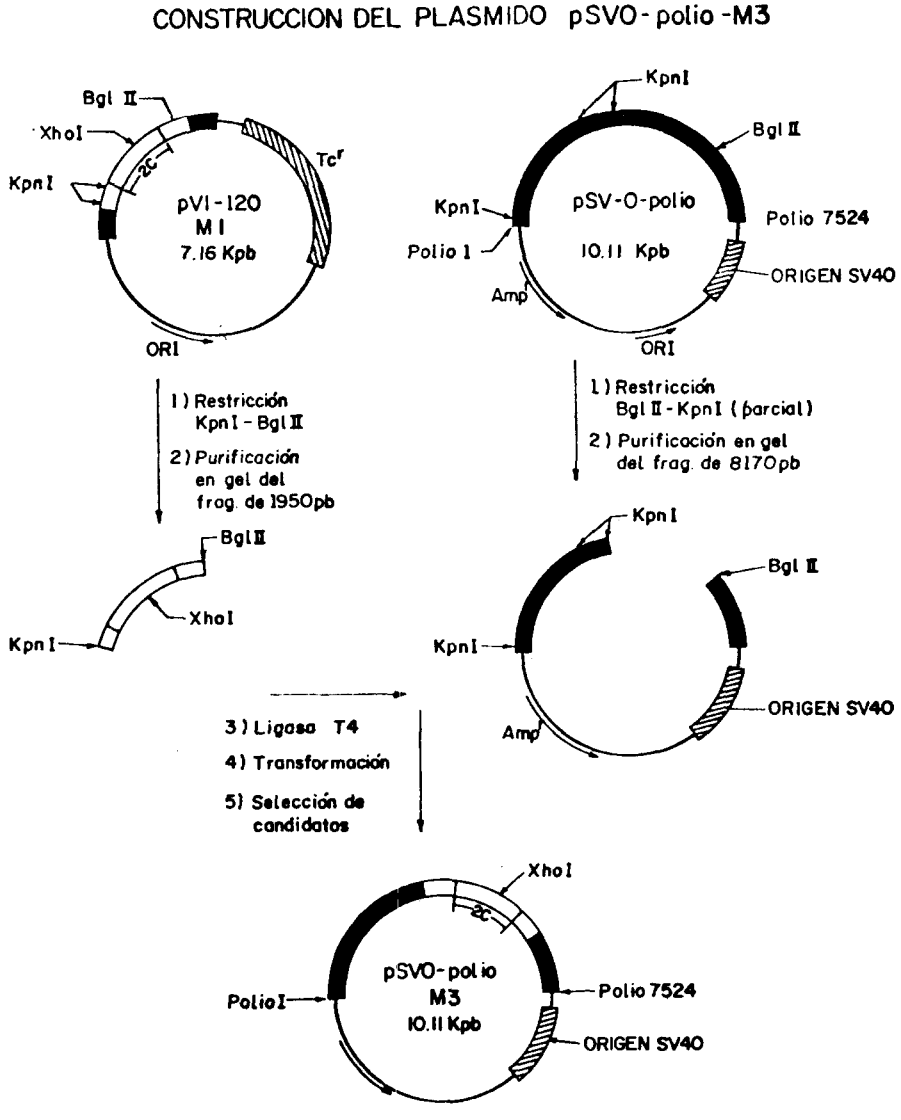


FIGURA 13.- Construcción del plásmido pSV-O-Polio-M3. El plásmido pVI-120-M1 tiene insertado un "linker" de 10 pb en la región que codifica para la proteína 2C. El plásmido pSV-O-Polio tiene el DNAc completo de Polio. Los dos plásmidos fueron cortados con KpnI y Bgl II (KpnI-parcial para pSV-O-Polio). El fragmento de 1950 pb de pVI-120-M1 fue purificado de un gel de agarosa de bajo punto de fusión para ligarlo con el fragmento de 8170 pb de pSV-O-Polio, purificado también de agarosa de b.p.f. Con este DNA se transformaron células E.coli HB101 para seleccionar posteriormente candidatos del plásmido pSV-O-Polio-M3.

Clonación de la región 2C del plasmido.
pV1-120-M1 en pSV-0-polio.

DNA	No de Transformantes sin ligasa	con ligasa
1) pSV-0-polio (10 ng)	1120	n.d.
2) pSV-0-polio/Bgl II-KpnI (10ng)	0	35
3) pSV-0-polio/Bgl II-KpnI (10ng) fragmento 2C/Bgl II-KpnI	n.d.	220

TABLA 2.- Números de transformación. Clonación de la región 2C de pV1-120-M1 en pSV-0-Polio. El ensayo se realizó en células E.coli HB101. Después de la transformación los 50 ul de células se extendieron con espátula de tubo de vidrio en cajas Petri con Luria-Ampicilina. Los valores representan los promedios de duplicados.

punto de fusión, ya que estas bandas migran muy cerca una de la otra. Por otra parte, la eficiencia de transformación del vector más el fragmento adicionado con ligasa, que fue de 22 transformantes por ng de DNA (tabla 2-3) es relativamente baja. Al parecer la clonación de fragmentos en plásmidos de tamaño grande como es pSV-O-polio no es muy eficiente.

Para seleccionar los candidatos se tomaron colonias E.coli HB101 resistentes a ampicilina y los plásmidos extraídos se digirieron primeramente con EcoRI esperando obtener dos fragmentos (ver Figura 4), uno de 7500 pb aproximadamente que corresponde al genoma completo de polio y un fragmento más pequeño que corresponde al vector de 2600 pb aproximadamente. Paralelamente se realizó una doble restricción con la misma enzima EcoRI más la enzima XhoI, basándonos en el nuevo sitio introducido por el "linker". Se esperaba obtener para los plásmidos recombinantes también dos fragmentos: uno de alrededor de 4820 pb correspondiente a la región del genoma de polio que va del sitio EcoRI (ver Figura 4) hasta el nuevo sitio XhoI. El otro fragmento, correspondiente al vector de 2600 pb, que migra junto con otro fragmento del mismo tamaño que va del sitio XhoI al siguiente sitio EcoRI.

En la figura 14 se observa este patrón de restricción para algunos candidatos (carriles 2-3, 9-10, 11-12) indicando plásmidos recombinantes. Se observan también, patrones de restricción no esperados (carriles 5-6, 7-8) que no corresponden a pSV-O-polio. Podrían ser plásmidos que han sufrido deleciones, perdiendo sitios de restricción, probablemente a consecuencia de la manipulación a lo largo del ensayo.

090986

SELECCION DE CANDIDATOS DEL PLASMIDO pSV-O-polio-M3



Restricción de candidatos con EcoRI y EcoRI-XhoI

FIGURA 14.- Selección de candidatos del plásmido pSV-O-Polio-M3. Después de la transformación, los candidatos del plásmido pSV-O-Polio-M3, se analizaron por restricción con EcoRI y doble restricción simultánea con EcoRI y XhoI. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa 0.7%. Los candidatos positivos (carriles 2-3, 9-10, 11-12, 17-18, 19-20) presentan un fragmento de 7500 pb y otro de 2600 pb después de la restricción con EcoRI (carriles 2, 9, 11, 17 y 19). Presentan también, un fragmento de 4820 pb y otro de 2600 pb posterior a la restricción EcoRI-XhoI (carriles 3, 10, 12, 18 y 20).

Los candidatos fueron mapeados con varias enzimas de restricción para corroborar su integridad antes de ser utilizados para transfecciones. La figura 15 muestra las diferencias en restricción para algunas enzimas entre los plásmidos pSV-O-polio y pSV-O-polio-M3. Evidentemente la enzima Xho I corta pSV-O-M3 (carril 7 y 9) no sucediendo lo mismo para el caso de pSV-O-polio (carril 6 y 8). El mapa de restricción de la mutante pSV-O-polio-M3 se puede observar en la figura 16.

c.) TRANSFECCION DE DNA A CELULAS 293.

Para analizar el efecto de la mutación producida por la inserción del "linker" XhoI en la secuencia 2C del DNAc de Poliovirus, se realizaron transfecciones a células de mamífero 293. Se utilizó esta línea celular porque expresa eficientemente el DNA introducido por transfección (Semler y cols., 1984). La línea celular 293 proviene de riñón de embrión humano, transformada con DNA de la región temprana de adenovirus (E1a). El plásmido pSV-O-polio (ver Figura 4) contiene, además del DNAc de Polio, la resistencia a Ampicilina y el origen de replicación de pBR322 para su expresión y selección en bacterias; contiene también el origen de replicación y señales de transcripción de SV40 para su expresión en eucariontes. Estas señales hacen más eficiente la expresión del plásmido en la célula después de la transfección (Semler y cols., op. cit.).

Las transfecciones se realizaron por el método de fosfato de calcio (ver Materiales y Métodos). Los resultados de estos experimentos se

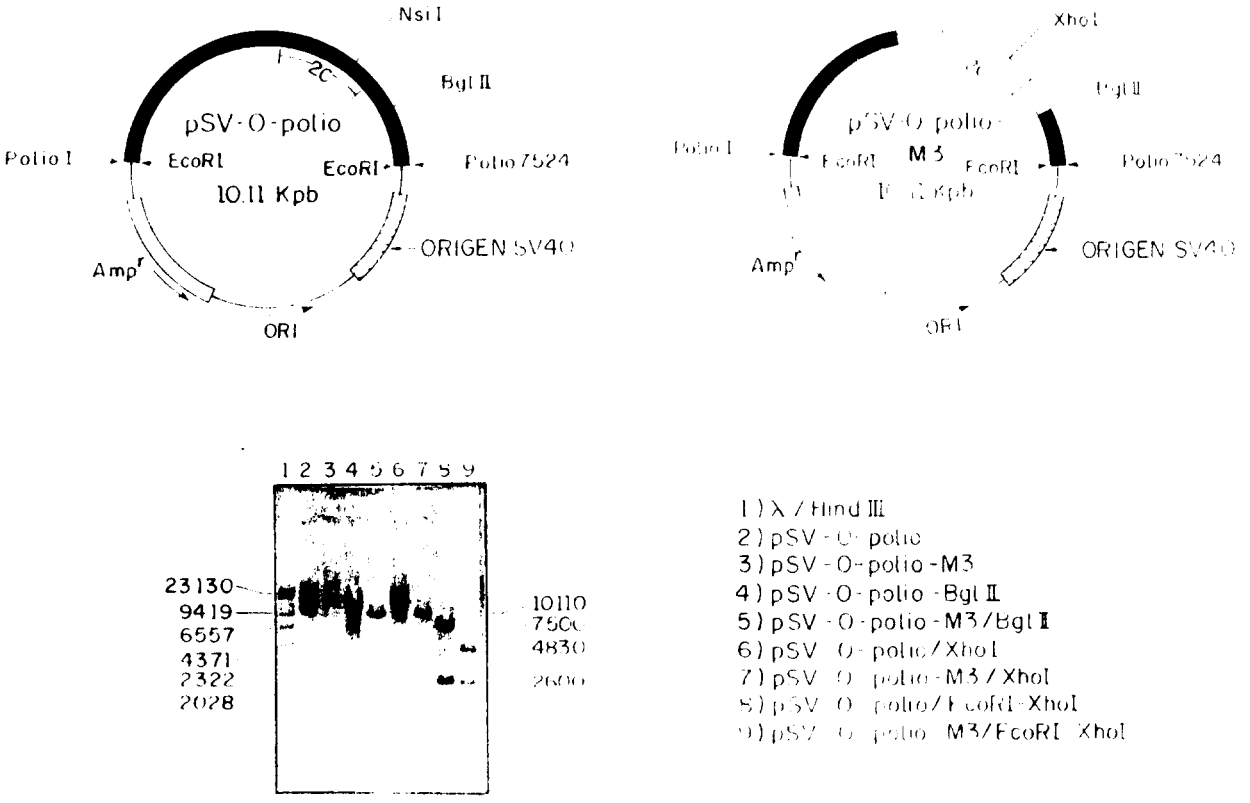
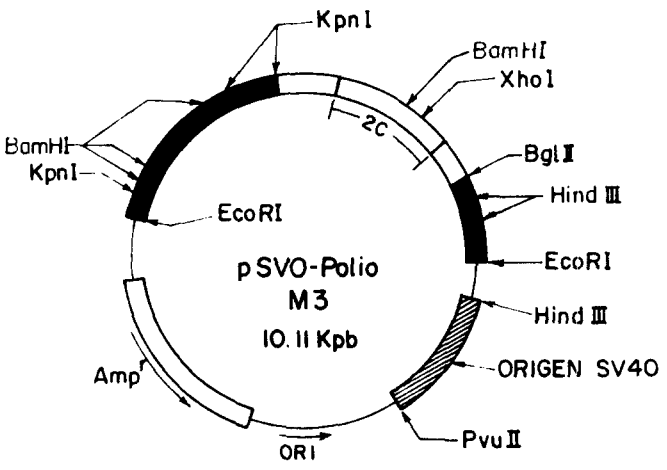


FIGURA 15.- Diferencias en el patrón de restricción entre pSV-O-Polio y pSV-O-Polio-M3. Los candidatos seleccionados de pSV-O-Polio-M3 se checaron mediante restricción con las diferentes enzimas indicadas. Las muestras se analizaron en un gel de agarosa 0.7% y se compararon con el patrón de restricción del plásmido original pSV-O-Polio. Se utilizó el fago lambda cortado con HindIII como marcador.

PATRON DE RESTRICCION DEL PLASMIDO pSVO -POLIO-M3



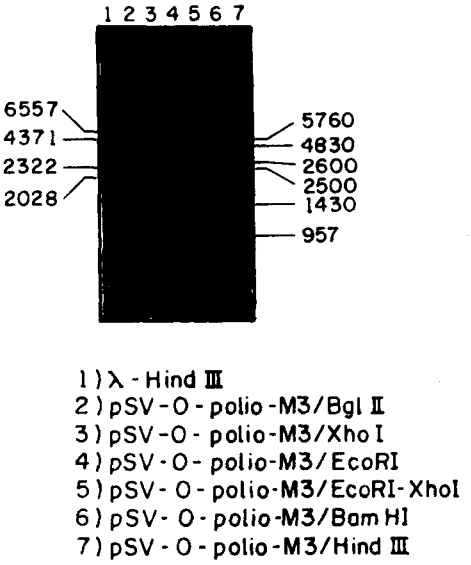


FIGURA 16.- Patrón de restricción de pSV-O-Polio-M3. Este plásmido contiene el DNAc completo de Polio, mutado en la región que codifica para la proteína 2C, mediante inserción de un "linker" XhoI de 10 pb. Contiene también secuencias de pBR322 (resistencia a ampicilina y origen) además del origen de replicación y el promotor de SV40 para su expresión en eucariontes. El plásmido se checó por restricción con las enzimas indicadas. El fago lambda cortado con HindIII se empleó como marcador.

resumen en la tabla 3. Cuando las células 293 fueron transfectadas con el plásmido pSV-O-polio, que contiene el DNAc del virus silvestre se obtuvieron placas de virus a 37°C, después de 4-5 días de incubación después de la transfección. Para el caso del plásmido mutado en la región 2C, pSV-O-polio-M3, no se obtuvieron placas después de 8 días de incubación a partir del momento de la transfección (ver Figura 17).

Para analizar la posibilidad de un fenotipo sensible a temperatura se realizaron experimentos de transfección a 32°C. No hubo una gran variación en el número de placas con respecto a la transfección a 37°C con el tipo silvestre (tabla 3-1). Con respecto a pSV-O-polio-M3, tampoco se produjeron placas después de la transfección a esta temperatura.

Por otra parte, para estudiar la posibilidad de que la mutante tuviera dependencia al inhibidor de replicación viral Guanidina, se realizaron transfecciones en presencia de 2mM de Hidrocloruro de Guanidina. No se observó formación de placas en las transfecciones con el plásmido mutado. Como era de esperarse tampoco se formaron placas en las transfecciones con el plásmido silvestre (tabla 3). Estos resultados sugieren que la proteína 2C tiene un papel esencial en el funcionamiento del virus.

d.) PRODUCCION DE VIRUS MEDIANTE COTRANSFECCION DE pSV-O-POLIO-M3 Y pSV-23.

Para demostrar que el carácter letal de la mutante se debía exclusivamente a la alteración introducida por la inserción del "linker" en la secuencia 2C, se realizaron experimentos de

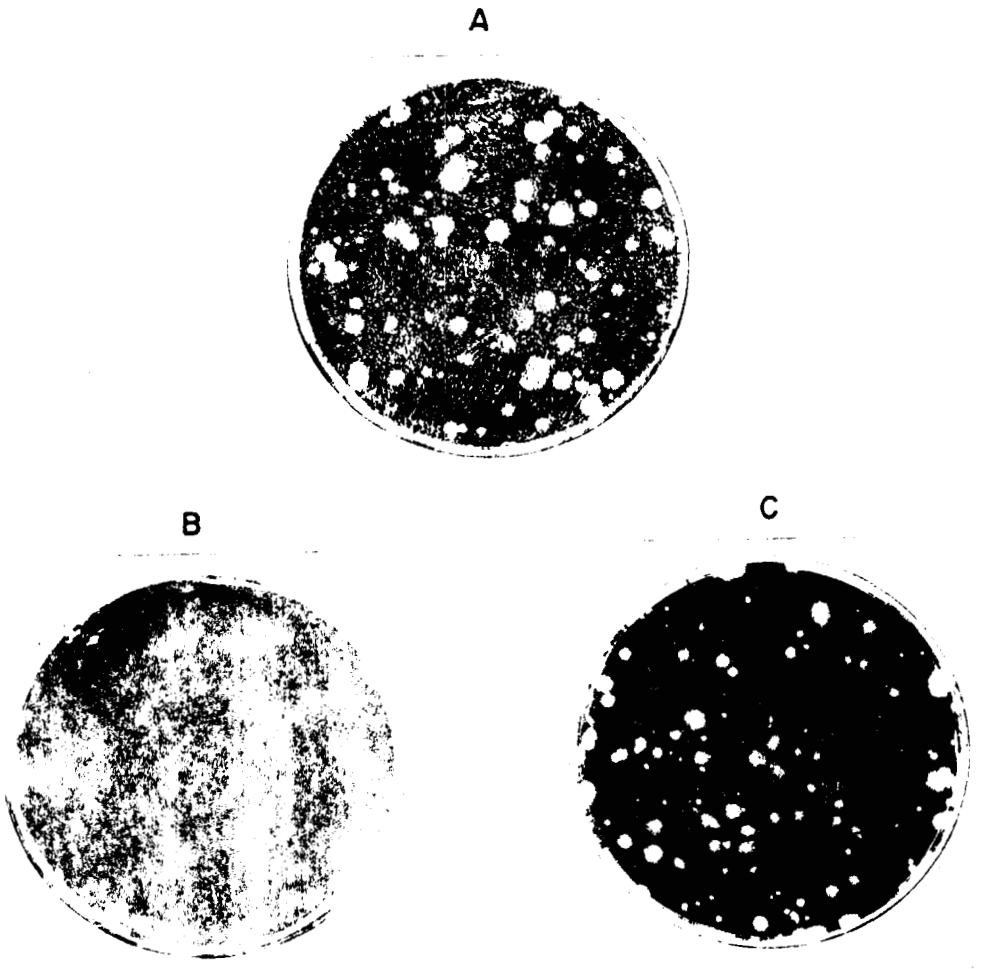


FIGURA 17.- Formación de placas después de transfección. Células 293 fueron transfectadas con los diferentes plásmidos. Las cajas se dejaron en incubadora hasta que las células se lisaron completamente. El lisado se congeló y descongeló 3 veces, se hicieron diluciones y se realizó un plaqueo sobre monocapas de células HeLa. (A)placas de pSV-O-Polio. (B) pSV-O-Polio-M3. (c) pSV-O-Polio-M3 + pSV-23.

cotransfeccion con los plásmidos pSV-O-polio-M3 y pSV-23 (ver Apêndice).

El plásmido pSV-23, es una subclona de pSV-O-polio construída en el laboratorio (Tapia-Ramírez, 1989) que carece de la región P1, secuencia que da lugar a las proteínas estructurales de Poliovirus (ver Figura 18). Sin embargo tiene las regiónes P2 y P3 del genoma silvestre sin ninguna alteración. Evidentemente este plásmido, al igual que pSV-O-polio-M3, es incapaz de producir virus infecciosos (tabla 3).

La cotransfección se realizó de la misma manera que una transfección normal; la diferencia fue la aplicación a la células de los dos plásmidos al mismo tiempo.

Las células en cultivo cotransfectadas fueron incubadas durante 8 días a 37°C, hasta observar lisis total. Este ensayo se realizó paralelamente a transfecciones con el tipo silvestre y los plásmidos cada uno por separado como controles. Las mezclas de lisis se colectaron, se congelaron y descongelaron tres veces para completar la lisis celular y se centrifugaron. Los sobrenadantes se diluyeron y se plaquearon sobre células HeLa en monocapa. Los resultados de la titulación se muestran en la tabla 3. No hubo formación de placas con pSV-O polio-M3, ni tampoco con pSV-23. Por el contrario, la cotransfección con estos dos plásmidos produjo la formación de 7.44 x 10^6 UFP por ug de DNA.

La formación de virus infecciosos a partir de la cotransfección de dos plásmidos letales se puede explicar en base a una posible recombinación entre los plásmidos como tales, o bien, recombinación

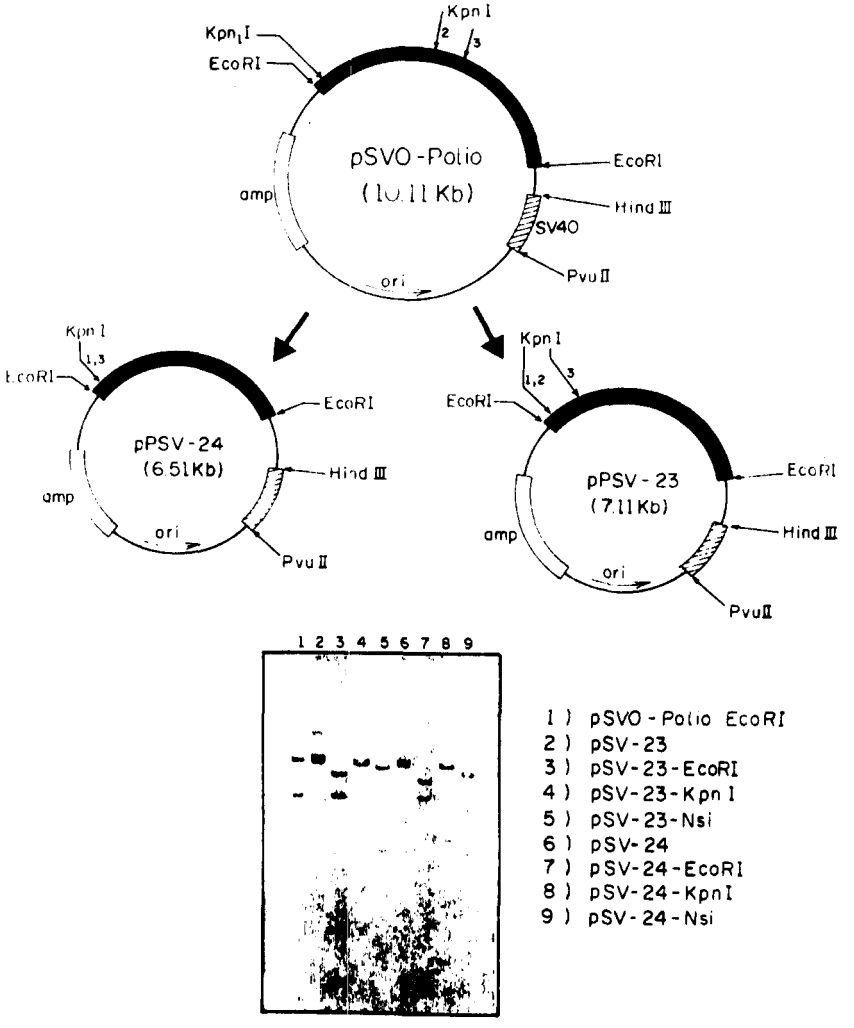


FIGURA 18.- Construcción del plásmido pSV-23. Este plásmido es una subclona de Polio. Se ha eliminado el fragmento KpnI -KpnI que corresponde a la región P1, misma que codifica para proteínas de la cápside viral. La secuencia de tripletes queda en fase. El gel muestra el patrón de restricción del plásmido (tomado de: Tapia-Ramirez, 1989).

entre los RNAs producto de la transcripción de los plásmidos o producto de la replicación del RNA viral. La recombinación entre genomas de Poliovirus, no es un evento raro (Kirkegaard y Baltimore, 1986). Se ha mostrado, como se indica en la Discusión, que los virus recombinantes tienen información de ambos "padres" (Romanova y cols., 1980; King y cols., 1982; Kirkegaard y Baltimore, op. cit.). De esta manera los dos plásmidos letales, al recombinarse son capaces de producir virus infectivos.

Este resultado sugiere que el plásmido pSV-O-polio-M3 no produce virus después de la transfección, debido a la alteración sufrida a consecuencia de la inserción de tres aminoácidos en la secuencia de la proteína 2C, ya que después de una posible recombinación con otro plásmido, letal también pero que tiene la secuencia 2C íntegra, es capaz de producir virus infectivos.

Eficiencia de Transfección
UFP x 10^6/ug DNA

	37°C	32°C	G
1) pSV-0-polio	4.94	4.4	0
2) pSV-0-polio-M3	0	0	0
3) pSV-23	0	n.d.	n.d.
4) pSV-0-polio-M3 + pSV-23	7.4	n.d.	n.d.

TABLA 3.- Eficiencia de transfección. Se presenta el número de unidades formadoras de placa (UFP) por ug de DNA de plásmido utilizado. Las transfecciones se realizaron en células 293 crecidas en monocapa en cajas p60, con 5 ug de plásmido por caja + 5 ug de DNA de esperma de salmón como acarreador. Después de la transfección las células se incubaron a diferentes temperaturas y en presencia de Guanidina hasta que se lisaron completamente. El lisado se congeló y descongeló 3 veces, se centrifugó y después de hacer diluciones con el sobrenadante se plaqueó sobre monocapas de células HeLa. Se utilizaron como controles positivo y negativo a los plásmidos pSV-0-Polio y pSV-23 respectivamente. Los valores representan los promedios de duplicados.

DISCUSION Y CONCLUSION

La clonación del DNAc de Polio y de otros miembros de la familia Picornaviridae, así como su capacidad para producir virus infecciosos, ha permitido el desarrollo de un análisis a nivel molécular de su genoma viral, lo que hace posible la definición precisa del papel de las proteínas virales en funciones específicas del virus.

Con base en estudios bioquímicos, se han propuesto al menos tres proteínas virales involucradas en la replicación de Polio (Wimmer y cols., 1987). Estas proteínas se encuentran ubicadas en la región P3 de la poliproteína (ver Figura 1). Una de ellas es la RNA polimerasa (3Cpol), otra es la proteínasa P3C (3Cpro) y la tercera es la proteína que se une al extremo 5' del genoma viral, denominada VPg. Asimismo en base a estudios genéticos (Pincus y cols., 1986) se ha sugerido que la proteína 2C (P2C) también participa en el proceso de replicación, ya que mutantes resistentes y/ó dependientes al inhibidor de replicación viral Guanidina se localizan precisamente en la región que codifica para esta proteína.

Con la finalidad de estudiar la posible función en replicación de la proteína 2C del virus de la poliomielitis se construyó una mutante en la región del genoma viral que codifica para dicha proteína. El plásmido pSV-O-polio-M3 (ver Apéndice y Figura 16) contiene el DNAc del genoma de Polio mutado en la posición 4826, construído mediante la inserción de un oligonucleótido de 10 pb. Tomando en cuenta la secuencia conocida del genoma de Polio (Van der Werf y cols., 1981; Racaniello y Baltimore, 1981 a), tal mutación daría lugar a la eliminación del aminoácido 237 Alanina, y a la inserción de tres

aminoácidos nuevos en la proteína 2C: Prolina, Arginina y Glicina, conservando la secuencia de aminoácidos a lo largo de la poliproteína. El plásmido contiene también el origen de replicación y el promotor de SV40, secuencias importantes para la replicación del plásmido y la transcripción del mismo en eucariontes.

Después de la transfección de pSV-O-Polio-M3 a células 293, no se encontró producción de virus infectivos, a diferencia de la transfección con el plásmido conteniendo el DNAc del tipo silvestre (pSV-O-polio). La mutante resulto ser no sensible a temperatura y continúa siendo sensible a Guanadina. Sin embargo, se encontró producción de virus infectivos después de cotransfectar células 293 con pSV-O-polio-M3 y el plásmido pSV-23 (ver Apêndice); este último contiene secuencias de pBR322 y de SV40, así como las regiones P2 y P3 de polio y sólo carece de la secuencia P1, región que da lugar a las proteínas de la cápside.

Estos resultados sugieren que 2C es esencial para el crecimiento viral. Esta proteína es altamente conservada entre los miembros de la familia Picornaviridae e incluso entre otras familias de virus. Se ha encontrado una fuerte homología de aminoácidos en proteínas similares de varios grupos de virus (Argos y cols., 1984), que sugiere un ancestro común para ciertas familias. En este sentido la proteína 2C debe cumplir una función de importancia vital para el desarrollo viral y la secuencia precisa de aminoácidos en determinados sitios debe tener tal importancia que la proteína puede ser extremadamente sensible a cambios, de modo que la inserción de tres aminoácidos en la posición 237 fue demasiado drástica para el funcionamiento correcto de la proteína, convirtiêndose en una mutación letal.

Se ha encontrado una secuencia de aminoácidos en 2C, Gly-Ser-Pro-Gly-Thr-Gly-Lys-Ser (Gorbalenya y cols., 1985), que va del aminoácido 129 al 136 de la proteína. Es posible que esta secuencia sea determinante para que tenga afinidad hacia RNA y le confiera capacidad para participar en la replicación. Esta secuencia en especial se ha encontrado en una variedad de proteínas probablemente involucradas en esa función (Gorbalenya y cols., 1985). Aunque el sitio de la mutación en 2 C (aminoácido 237) se encuentre relativamenate alejado de esa secuencia consenso, es posible que la estructura secundaria de la proteína se altere de tal forma a consecuencia de la mutación, que no deje expuesta esa región importante para su interacción con RNA.

Es muy probable que los tres aminoácidos insertados: prolina, arginina y glicina provoquen un cambio en la estructura secundaria de la proteína 2C con la consecuente alteración de sus sitios funcionales. Siempre que en una cadena polipeptídica aparece la Prolina, la helice alfa se interrumpe y se origina un pliegue rígido o curvatura (Lehninger, 1982). Por el contrario, el aminoácido alanina que fue eliminado, al parecer estabiliza cadenas de hélice alfa.

Los fenotipos de resistencia o dependencia a Guanidina mapean ligeramente a la izquierda del sitio en donde se realizó la inserción. Las mutantes resistentes (GR) contienen una mutación en la misma posición, el aminoácido 179. Las dependientes (GD), además del aminoácido 179, tienen otro cambio en el sitio 227 (Pincus y cols.,1986). En todos los casos la mutación ocurre por remplazo de aminoácido, como resultado de cambios en nucleótidos en la primera o

segunda posición del codón. Es probable que esta región sea de especial importancia para la proteína puesto que, además de que enmarca la resistencia al inhibidor de replicación viral, es una de las regiones de la proteína más conservadas entre grupos de virus. Comprende el 25% de la secuencia de aminoácidos, del número 142 al 227 de la proteína 2C (Pincus y cols., op. cit). Estas mutaciones solamente involucran el intercambio de un aminoácido (GR) o dos, en posiciones diferentes (GD). En ninguna de ellas interviene el aminoácido Prolina y aparentemente, la respuesta a Guanidina no altera la estructura secundaria de 2C. Esto es importante en el sentido en que, siendo esta región probablemente esencial en el funcionamiento de 2C, la alteración que da lugar a las mutantes GR o GD es relativamente pequeña, ya que produce virus viables, en contraste con la alteración provocada por la inserción de tres aminoácidos, entre ellos la prolina que da lugar a una mutación letal. Esto sugiere que el cambio en la secuencia de aminoácidos de 2C no afectaría directamente a sitios funcionales de la proteína, sino más bien estos serían alterados, como consecuencia de un cambio en la estructura secundaria de la misma.

Un cambio en la estructura podría alterar también, la interacción de la proteína con el RNA debido a la alteración en la posición de grupos de carga positiva que perderían su afinidad por ácidos nucleicos. Por otra parte, aún cuando al parecer la proteína 2C carece de regiones fuertemente hidrofóbicas para su asociación a membranas (Takegami y cols., 1983), contiene alrrededor del 38% de aminoácidos no polares que podrían determinar, hasta cierto punto, su asociación entre si y su interacción con membranas, sitio donde se lleva a cabo

la replicación viral (Butterworth y cols., 1976; Wimmer y cols., 1987). Tal interacción se vería afectada con un cambio grande en la estructura secundaria . Además, se piensa que un punto determinante en la asociación de 2C con membranas es su afinidad al grupo amino-terminal de la proteína 3AB (ver Figura 1D). Este péptido se une a membranas debido a una fuerte región hidrofóbica que contiene (Kuhn y cols., 1988). Asimismo es el precursor de la proteína VPg (Wimmer y cols., op. cit), que se ha propuesto funciona como "primer" en la iniciación de la síntesis de RNA viral (Baron y Baltimore, 1982; Kitamura y cols., 1980; Takegami y cols., 1983). La asociación de estas proteínas en el complejo de replicación, podría verse afectada evidentemente por una alteración en la estructura de 2C.

Se ha propuesto a P2C como un factor que participa en la iniciación de síntesis de cadenas de RNA, ya que la sensibilidad a Guanidina se encuentra en esta proteína (Pincus y cols., op. cit) y existe evidencia de que tal inhibidor de replicación viral, bloquea precisamente ese paso de la síntesis de RNA (Tershak, 1982).

Resumiendo, se puede decir, que el carácter letal de la mutante construida en esta investigación, carácter provocado por la inserción de los aminoácidos pro, arg y gly en el sitio 237 de la proteína 2C, sugiere una posible modificación en la estructura secundaria de la proteína, de manera que indirectamente se habrían alterado sitios funcionales para su interacción con RNA (secuencia consenso y grupos de carga +) o para su interacción con membranas y/ó complejo replicativo (grupos no polares y asociación con la proteína 3AB) perdiendo su posible actividad en la iniciación de síntesis de RNA viral.

Sin embargo, existe también la posibilidad de que se hayan producido deficiencias en el procesamiento de 2C. El único producto de traducción sintetizado por Poliovirus es una poliproteína (Jacobson y Baltimore, 1968) que se procesa durante la traducción. En este fenómeno participan dos proteasas: 2A que se encuentra en la región P2 (ver Figura 1-D) y que participa en el rompimiento entre los aminoácidos Tyr-Gly (Toyoda y cols., 1986) y la proteasa 3C, que se encuentra en la región P3 y promueve los rompimientos entre Gln-Gly (Hanecak y cols., 1982). Sin embargo, no todos los pares de aminoácidos Gln-Gly que se encuentran en la poliproteína se rompen por la acción de la proteasa 3C. Al parecer se requieren señales adicionales en la estructura primaria o secundaria de la poliproteína para que el rompimiento ocurra (Nicklin y cols., 1986). La proteína 2C madura por la acción de esta proteasa, de modo que un cambio en la estructura primaria o secundaria provocada por la inserción de tres aminoácidos podría alterar esas señales adicionales, impidiendo su procesamiento.

Además, se ha observado que las señales Gln-Gly reconocidas por la proteasa 3C, preferentemente contienen alanina en la posición del aminoácido 4 cercano al sitio de corte (Niklin y cols., op. cit). Probablemente, la Alanina sea una señal reconocida no solamente si se encuentra en esa posición cercana al sitio Gln-Gly, sino en algún otro lugar específico de la secuencia. En la mutante construída, se ha eliminado el aminoácido alanina de la posición 237. Esta pérdida podría ser importante para un correcto procesamiento de 2C.

Por otra parte, no se puede descartar que las inserciones puedan

alterar la estructura secundaria del RNA y causen defectos que impidan la replicación. Ciertas interacciones de segmentos del RNA pueden resultar en la formación de estructuras funcionales que determinen la eficiencia de ciertos pasos en la replicación.

Los razonamientos anteriores sugieren que la falta de viabilidad de la mutante se puede explicar básicamente, por una alteración de la estructura secundaria del RNA, de la poliproteína o más probablemente de la proteína 2C. El hecho de alterar la estructura genómica de Poliovirus ha conducido a la pérdida de viabilidad de muchas mutantes (ver Kuhn y cols., 1988, Wimmer y cols., op. cit) Específicamente para la proteína 2C, muchas inserciones en la mayor parte de la región que codifica para 2C, recientemente reportadas (Jing-Poli y Baltimore, 1988), han sido letales. Esto muestra, una gran falta de flexibilidad en la secuencia de aminoácidos de una proteína 2C funcional. Sin embargo, es importante mencionar que se reportaron (Jing-Poli y Baltimore, op. cit.), paralelamente a nuestros resultados, dos mutantes en la proteína 2C, a la derecha del sitio donde se localiza el locus de Guanidina y la mutante construída en este trabajo, que son deficientes en la replicación viral, lo que concuerda precisamente con nuestra hipótesis sobre la posible función de la proteína 2C.

Por otra parte, el hecho de que se produzcan virus infectivos después de la cotransfección con dos mutantes letales: pSV-O-polio-M3 y pSV-23 se puede explicar en base a una posible recombinación entre RNAs, producto de la transcripción de los plásmidos cotransfectantes.

Se desconoce el mecanismo, por medio del cual la infección de polio se inicia en células cotransfectadas con el DNAc. Sin embargo, es

evidente que el plásmido se transcribe y que la infección se inicia.

La recombinación entre genomas de polio no es un evento raro. Ya desde los años 60s, se observó (Ledinko, 1963) que una proporción de la progenie obtenida a partir de la infección con dos diferentes líneas de Poliovirus, heredaba características fenótipicas de ambos padres, lo que sugería una recombinación intermolecular entre genomas de RNA. Este fenómeno ha sido posteriormente demostrado por estudios genéticos y bioquímicos (Tolskaya y cols.,1983,1987; Emini y cols., 1984; Romanova y cols., 1986; Kirkegaard y Baltimore, 1986).

Se ha propuesto que la recombinación entre genomas de polio, ocurre por un mecanismo denominado "copy choice". Según este modelo (figura 19), la replicación del RNA se inicia en una cadena gracias a la RNA polimerasa viral y otros factores, y puede continuar en una segunda molécula de RNA viral (Kirkegaard y Baltimore, op. cit). Aparentemente, la síntesis de una cadena de RNA (-) recombinante, ocurre entre dos templados de RNA de cadena (+), iniciándose la replicación en una y continuando en otra. Estas cadenas probablemente se encuentran unidas mediante regiones homólogas o complementarias (Romanova y cols., op. cit; Tolskaya y cols., 1987), lo que da lugar a la presencia de caracteres fenotípicos de ambos "padres" en los virus recombinantes.

Según el modelo descrito, después de la cotransfección los plásmidos se transcriben en el núcleo . Posteriormente los RNAs viajan al citoplasma y se traducen, formando proteínas virales funcionales, al menos para el caso de pSV-23; proteínas que participan en la replicación del RNA. Esta debe iniciarse, para producir virus

MODELO DE RECOMBINACION ENTRE GENOMAS DE RNA

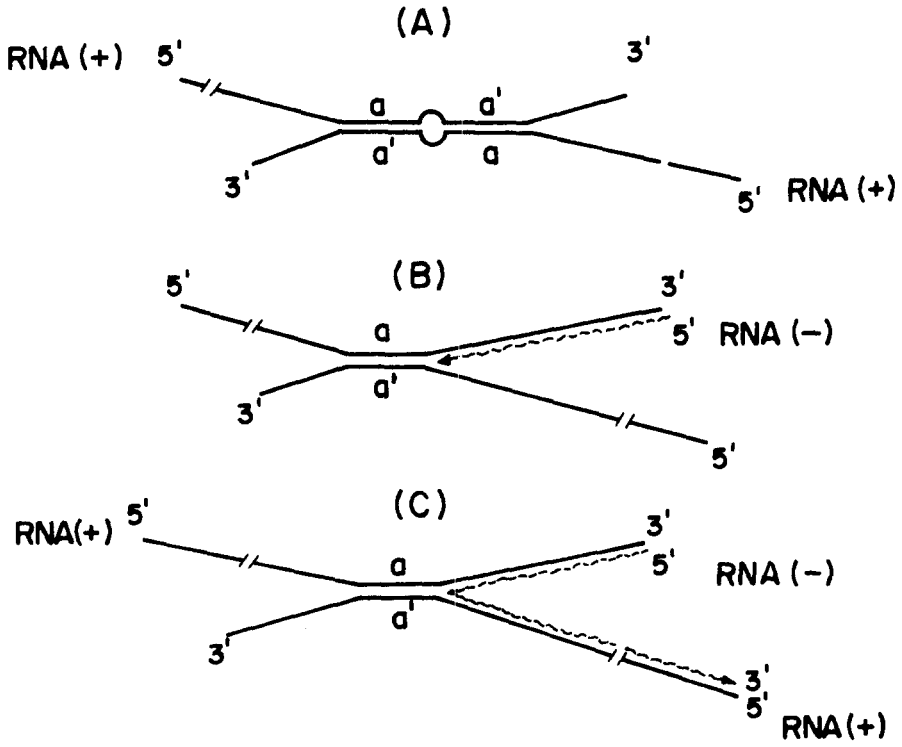


FIGURA 19.- Modelo de recombinación entre genomas de RNA. Las regiones complementarias que se asocian se representan por a y a'. Las líneas sólidas corresponden a moléculas de RNA. Las líneas punteadas representan a la nueva cadena de RNA "recombinante" que se está sintetizando (Modificado de Romanova y cols., 1986).

infectivos, en el extremo 3' del RNA (+) producto de pSV-23 (RNA-23). Este RNA se asociaría mediante regiones homólogas con la cadena de RNA producida por el plásmido mutante pSV-O-M3 (RNA-M3) (ver Figura 20). La replicación del RNA-23 continuaría hasta el inicio de la doble cadena de regiones homólogas. La Polimerasa viral "saltaría" a al cadena RNA-M3 continuando la replicación sobre esta última hasta el extremo 5' de la misma.

El producto sería una cadena de RNA (-) recombinante, que serviría de templado para formación de cadenas (+), mismas que servirían para traducción o encapsidación.

El modelo implica que la recombinación debe ocurrir a la derecha del sitio de la mutación (según el esquema de la Figura 20), para dar lugar a la producción de virus infectivos en el caso de los experimentos de cotransfección. Es evidente que la recombinación a la izquierda de la mutación, daría como resultado la no viabilidad del recombinante.

El fenómeno de recombinación no ha sido completamente entendido. El carácter "letal" de la mutante construida, así como el sitio y el conocimiento de la naturaleza precisa de la mutación, son factores importantes que podrían servir para posteriores estudios de recombinación entre genomas de virus.

Una posible aplicación de estos estudios, sería el desarrollo de formas recombinantes del virus que, siendo letales, atenuarían o eliminarían el proceso infectivo, produciendo formas patológicas incapaces de continuar la infección. Asimismo, el desarrollo de plásmidos con el DNAc de Polio, que contengan mutaciones letales

MODELO DE RECOMBINACION ENTRE GENOMAS DE RNA 23 Y RNA M3

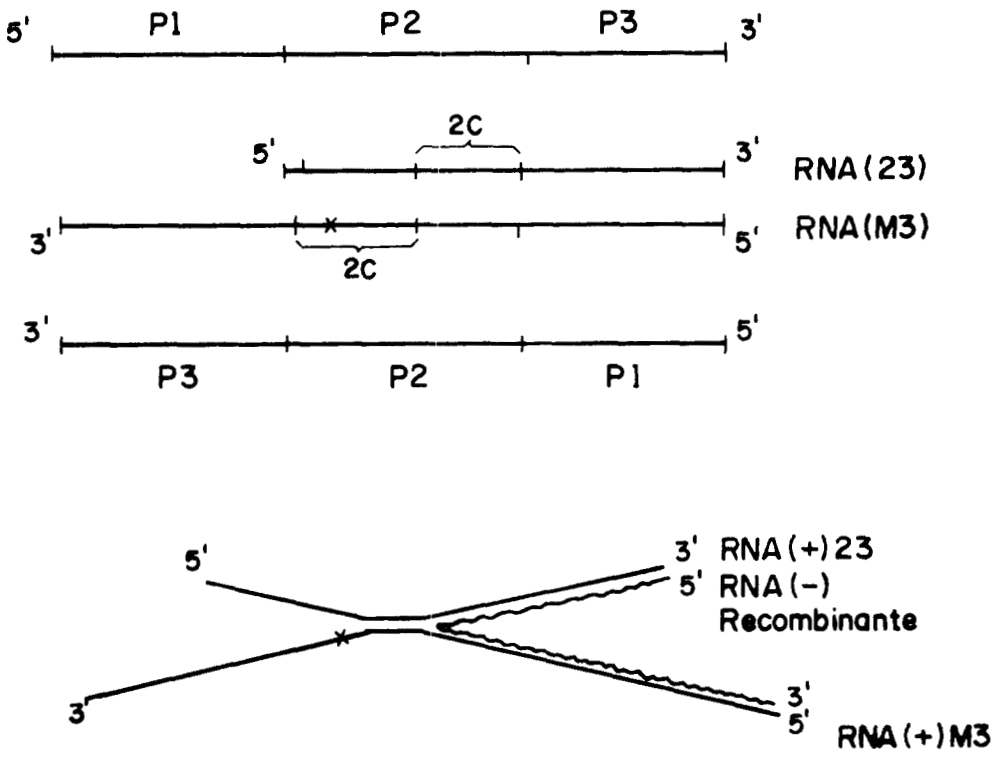


FIGURA 20.- El RNA de ambos genomas se representa dividido en 3 regiones (P1, P2 y P3). La molécula del RNA(23) carece de la región P1. La molécula de RNA(M3) presenta una mutación en la región que codifica para 2C (X). El modelo implica la asociación de regiones complementarias entre cadenas de RNA (+), representadas por líneas sólidas. La línea discontinua representa la cadena de RNA recombinante (-). El sitio de recombinación se encuentra a la "izquierda" de la mutación, hacia la región P1, sobre el RNA(+)M3.

capaces de sufrir recombinación genética después de una cotransfección, es un aporte importante del presente estudio que puede abrir nuevos caminos hacia el entendimiento de la Biología Molecualr de la poliomielitis.

Por último, sería interesante estudiar las probables deficiencias en el procesamiento de la proteína 2C provocada por la mutación mencionadas anteriormente, lo que sería probablemente un avance en el conocimiento de factores importantes para un correcto procesamiento de proteínas virales mediadas por la proteína 3Cpro.

REFERENCIAS

AMBROS,V., PETTERSON, R.F. y D. BALTIMORE (1978) An enzimatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5'-terminal protein. Cell 15:1439.

ANDREWS, N.C., LEVIN, D. y D. BALTIMORE (1985) Poliovirus replicase stimulation by terminal uridylyl-transferase. J.Biol. Chem. 260:7628.

ANDREWS, N. y D. BALTIMORE (1986) Purification of a terminal uridylyltransferase that acts as host factor in the in vitro poliovirus replicase reaction. Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 83:221.

BARON, M.H. y D. BALTIMORE (1982) Antibodies against the chemically synthesized genome-linked protein of poliovirus react with native, virus-specific proteins. Cell 28:395.

BERROW, R. (ed.) (1978) Enfermedades virales del sistema nervioso central. Poliomielitis. Manual Merck. Merck Sharp & Dohme International p. 54.

BERNSTEIN, H.D., SONENBERG, N. y D. BALTIMORE (1985) Poliovirus mutant that does not selectively inhibit host cell protein synthesis. Mol. Cell Biol. 5:2913.

BERNSTEIN, H., SARNOW, P. y D. BALTIMORE (1986) Genetic complementation among poliovirus mutants derived from an infectious cDNA clone. J. Virol. 60:1040.

BIENZ, K., EGGER, D. y C. PASAMONTES (1987) Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualzed by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. Virology 160:220.

BUTTERWORTH, B., SHIMSHICK, E. y F. YIN (1976) Association of the polioviral RNA polymerase complex with phospholipid membranes. J.

Virol. 19:457.

CALIGUIRI, L.A. y I. TAMM (1968) Action of guanidine on the replication of poliovirus RNA. Virology. 35 408.

CALIGUIRI, L.A. y I. TAMM (1970) The role of cytoplasmic membranes in poliovirus biosynthesis. Virology. 42:100.

CANN, A., STANWAY, G., HUGHES, P., MINOR, P., EVANS, D., SCHILD, G. y J. ALMOND (1984) Reversion to neurovirulence of the live-attenuated Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. Nucl. Acids Res. 12:7787.

CANTERO-AGUILAR, L., SANCHEZ-TRUJILLO, A., y FERNANDEZ-TOMAS, C., (1987) Poliovirion-derived capsid proteins in subviral ribonucleoprotein complexes. Virology 156:259.

CURREY, K., PETERLIN, y M., MAIZEL, J.V. (1986) Secondary structure of poliovirus RNA: correlation of computer-predicted with electron microscopically observed structure. Virology 148:33.

DEL ANGEL R.M., PAPAVASS-YLIOU, A.G., FERNANDEZ-TOMAS, C. SILVERSTEIM. S.J. Y V.R. RACANIELLO (1989) Cell proteins bind to multiple sites within the 5' untranslated region of poliovirus RNA. Proc. Natn. Acad. Sci. (enviado para su publicación).

DORNER, A.J., ROTHBERG, P.G. y E. WIMMER (1981) The fate of VPg during in vitro traslation of poliovirus RNA. FEBS Lett. 132:219.

EMINI, E., LEIBOWITZ, J., DIAMOND, D.C., BONIN, J., y E. WIMMER (1984) Recombinants of Mahoney and Sabin strain poliovirus type I. Analysis of in vitro phenotypic markers and evidence that resistance to guanidine maps in the nonstructural protein. Virology. 137:74.

ETCHINSON, D. y E. EHRENFELD (1981) Comparison of replication complexes synthesizing poliovirus RNA. Virology 111:33.

FERNANDEZ-TOMAS, C. y D. BALTIMORE (1973) Morphogenesis of poliovirus II. Demostration of a new intermediate, the provirion. J. Virol.

12:1122.

GORBALENYA, A.E. y SUITKIN, Y.V. (1983) Encephalomyocarditis virus protease purification and role of the SH groups in processing of the precursor of structural proteins. Biochemistry (U.S.S.R.) 48:442.

GORBALENYA, A.E., BLINOV, V.M. y KOONIN, E.V. (1985) Prediction of nucleotide-binding properties of virus-specific proteins from their primary structure. Mol Genet. NII, 30.

GRAHAM, F., SMILEY, J., RUSSELL, W. y R. NAIRN (1977) Characteristics of a human Adenovirus type 5. J. Gen. Virol. 36:59.

HANECAK, R., SEMLER, B.L., ANDERSON, C.W. y E. WIMMER (1982) Proteolytic processing of poliovirus polypeptides: antibodies to polypeptide P3-7C inhibit cleavage at glutamine-glycine pairs. Proc. Natn. Acad. Sci. USA. 79:3973.

HANECAK, R., SEMLER, B.L., ARIGA, H., ANDERSON, C.W. y E. WIMMER (1984) Expression of a cloned gene segment of poliovirus in E.coli: evidence for autocatalytic production of the viral proteinase. Cell 37:1063.

HEY, T., RICHARDS, C. y E. EHRENFELD (1986) Synthesis of plus and minus-strand RNA from poliovirion RNA template in vitro. J.Virol. 58:790.

HOGLE, J.M., CHOW, M. y D. FILMAN (1985) Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 A resolution. Science 229:1358.

HUGHES, P., EVANS, D., MINOR, P., SCHILD, G., ALMOND, J. y STANWAY, G. (1986) The nucleotide sequence of a type 3 poliovirus isolated during a recent outbreak of poliomyelitis in Finland. J. Gen Virol. 67:2093.

ISH-HOROWITZ, D., y J. BURKE (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. Nucl. Acids. Res. 9:2989.

IVANOFF, C. A., TOWATARI, T., RAY, J., KORANT, B.D. y S. R. PETTEWAY (1986) Expression and site-specific mutagenesis of the poliovirus 3C protease in E.coli. Proc. Natn. Acad. Sci. USA 83:5392.

JACOBSON, M. F., y D. BALTIMORE (1973) Morphogenesis of poliovirus. II. Demostration of a new intermediate, the provirion. J. Virol. 12:1122.

JACOBSON, M.F. y D. BALTIMORE (1968) Polypeptide cleavage in the formation of poliovirus proteins. Proc. Natn. Acad. Sci. USA. 61:77.

JING-PO LI y D. BALTIMORE (1988) Isolation of poliovirus 2C mutants defective in viral RNA synthesis. J. Virol. 62:4016.

KING, A. M., McCAHON, D., SLADE, W.R. y J. NEWMAN (1982) Recombination in RNA. Cell 29:921.

KIRKEGAARD, K. y D. BALTIMORE (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. Cell. 47:433.

KITAMURA, N., ADLER, C.J., ROTHBERG, P.G., MARTINKO, J., NATHENSON, S.G. y E. WIMMER (1980) The genome-linked protein of picornaviruses. VII genetic mapping of poliovirus VPg by protein and RNA sequence studies. Cell. 21:295.

KITAMURA, N.,B.L., SEMLER, P.G., ROTHGERG, G.R. LARSEN, C.J. ADLER, A.J. DORNER, E.A. EMINI, R. HANECAK, J.J. LEE, S.VAN DER WERF, C.W. ANDERSON Y E. WIMMER (1981) Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. Nature (London)291:547-553.

KUNTZ, H. y B. ROSENWIRTH (1988) Purification and partial characterization of poliovirus protease 2A by means of a functional assay. J. Virol. 62:1243.

KUGE, s. y A. NOMOTO (1987) Construction of viable deletion and insertion mutants of the Sabin strain type I poliovirus: function of the 5' noncoding sequence in viral replication. J. Virol. 61:1478.

KUHN, R., TADA, H., YPMA-WONG, M., SEMLER, B., y E. WIMMER (1988) Mutational analysis of the genome-linked protein VPg of poliovirus. J.Virol. 62:4207.

LEDINKO, N. (1963) Genetic recombination with poliovirus type I. Studies of crosses berween a normal horse serum-resistant mutant and several guanidine-resistant mutants of the same strain. Virology. 20:107.

LEHNINGHER, A. (1982) Proteínas: conformacion tridimensional. p. 127-159. En: Bioquímica. Omega, Barcelona.

LEVINTOW, L., (1974) The reproduction of picornaviruses, in Comprehensive Virology, 2 (Corat, F. y Wagner eds.) Plenum Press, N.Y.

LLOYD, R.E., TOYODA, H., ETCHISON, D., WIMMER, E. y EHRENFELD, E. (1986) Cleavage of the cap binding protein complex polypeptide p220 is not effected by the second poliovirus protease 2A. Virology. 150:299.

LOMBERG-HOLM, K., (1975) The effects of concanavalin A, on the early events of infection by Rhinoviruses type 2 and poliovirus type 2. J. gen, Virol. 28:313.

LURIA, S. E., DARNELL, J.E., BALTIMORE, D. y A. CAMPBELL (1978) Animal viruses adsorption and entry into the cell, in General Virology, Wiley, N.Y. 306.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. y SAMBROOK, J. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

NICKLIN, M., TOYODA, H., MURRAY, M. y E. WIMMER (1986) Proteolytic processing in the replication of polio and related viruses. Biotechnology, 4:33.

NOBEL, J., y LEVINTOW (1970) Dynamics of poliovirus specific RNA

synthesis and the effects of inhibitors of virus replication. Virology 42:634.

OMATA, T., KOHARA, M., SAKAI, Y., KAMEDA, A., IMURA, N. y A. NOMOTO (1984) Cloned infectious complementary DNA of the poliovirus Sabin I genome: biochemical and biological properties of the recovered virus. Gene, 32:1.

PELLETIER, J., KAPLAN, G., RACANIELLO, V. y SONENBERG, N. (1988) Cap-independent traslation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5'noncoding region. Mol. Cell Biol., 8:1103.

PINCUS, S., DIAMOND, D., EMINI, E. y E. WIMMER (1986a) Guanidine-selected mutants of poliovirus: mapping of point mutations to polypeptide 2C. J. Virol. 57:638.

PINCUS, S. y E. WIMMER (1986b) Production of guanidine-resistant and dependent poliovirus mutant from cloned cDNA: mutations in polypeptide 2C are directly responsible for altered guanidine sensitivity. J. Virol. 60:793.

PINCUS, S., ROHOL, H. y E. WIMMER (1987) Guanidine-dependent mutants of poliovirus: identification of three classes with different growth requirements. Virology, 157:83.

PUTNACK, R., y B. PHILLIPS (1982) Poliovirus empty capsid morphogenesis I. Evidence for conformational differences between self and extract-assembled empty capsids. J. Virol., 41:792.

RACANIELLO, V.R., y D. BALTIMORE (1981a) Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. Science. 214:916.

RACANIELLO, V. y D. BALTIMORE (1981b) Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. Proc.Natn. Acad. Sci. USA. 78:4887.

REKOSH, K., (1977). The molecular biology of picornavirus, in The

Molecular Biology of Animal Viruses, I, (P.Nayak, ed.) Marcel Dekker, N.Y.

ROMANOVA, L.I., TOLSKAYA, E., KOLESNIKOVA, M., y V. AGOL (1980) Biochemical evidence for intertypic genetic recombination of polioviruses. FEBS Lett. 118:109.

ROMANOVA, L. I., BLINOV, V., TOLSKAYA, E., VIKTOROVA E., KOLESNIKOVA, M., GUSEVA, E. y V. AGOL (1986) The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: A model of recombination betwwen RNA genomes. Virology. 155:202.

SABIN, A. (1985) Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. J. Infect. Dis. 151:420.

SARNOW, P., BERNSTEIN, H. y D. BALTIMORE (1986) A poliovirus temperature-sensitive RNA synthesis mutant located in a non-coding region of the genome. Proc. Natn. Acad. Sci. 83:571.

SEMLER, B., DORNER, A., y E. WIMMER (1984) Production of infectious poliovirus from cloned cDNA is dramtically increased by SV40 transcription and replication signals. Nuc. Acids Res. 12:5124.

SCHOROM, M., LAFFIN, J.A., EVANS, B., McSHARRY, J. y L. CALIGUIRI (1982) Isolation of poliovirus variants resistant to and dependent on Arildone. Virology 122:492.

SPECTOR, D., y D. BALTIMORE (1975) Polyadenylic acid on poliovirus RNA II Poly (A) on intracellular RNA. J. Virol., 15:1418.

TAKEDA, N., KUHN, R., YANG, CH., TAKEGAMI, T. y E. WIMMER (1986) Initiation of poliovirus plus-strand RNA synthesis in a membrane complex of infected HeLa cells. J. Virol. 60:43.

TAKEGAMI, T., KUHN, R., ANDERSON, C. y E. WIMMER (1983a) Membrane-

dependent uridylylation of the genome-linked protein VPg of poliovirus. Proc. Natn. Acad. Aci. USA. 80:7447.

TAKEGAMI, T., SEMLER, B., ANDERSON, C. y E. WIMMER (1983b) Membrane fractions active in poliovirus RNA replication contain VPg precursor polypeptides. Virology. 128:33.

TAPIA-RAMIREZ, J. (1989) Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.

TERSHAK, D., (1982) Inhibition of poliovirus polymerase by guanidine in vitro. J. Virol. 41:313.

TOLSKAYA, E., ROMANOVA, L., KOLESNIKOVA, M. y V. AGOL (1983) Intertypic recombination in poliovirus: genetic and biochemical studies. Virology 124:121.

TOLSKAYA, E., ROMANOVA, L., BLINOV, V., VIKTOROVA, E., SINYAKOV A., KOLESNIKOVA, M. y V. AGOL (1987) Studies on the recombination between RNA genomes of poliovirus: the primary structure and nonrandom distribution of crossover regions in the genomes of intertypic poliovirus recombinants. Virology 161:54.

TOYODA, H., NICKLIN, M., MURRAY, M., ANDERSON, C., DUNN, J., STUDIER, F. y E. WIMMER (1986) A second virus encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. Cell, 45:761.

VAN DER WERF, S., BREGERE, F., KOPECKA, H., KITAMURA, N., ROTHBERG, P., KOURILAKY, P., WIMMER, E. y M. GIRARD (1981) Molecular cloning of the genome of poliovirus type 1. Proc. Natn. Acad. Sci. 78:5983.

WILLINGMANN, P., BARNET, H., ZEICHARDT, H. AND K.O. HABERMEHL (1989) Recovery of structuraly intact and infectious poliovirus type 1 from HeLa cells during receptor-mediated endocytosis. Virology, 168:417-420.

WIMMER, E. (1982) Genome-linked proteins of viruses. Cell, 28:199.

WIMMER, E., KUHN, R., PINCUS, S., YANG, CH., TOYODA, H., NICKLIN, M. y N. TAKEDA (1987) Molecular events leading to picornavirus genome replication. J. Cell Sci. Suppl.7, 251.

YOUNG, D.C., TUSCHALL, D. y FLANEGAN, J. (1985) Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase and host cell protein synthesize product RNA twice the size of poliovirion RNA in vitro. J. Virol. 54:256.

APENDICE

Cuadro que resume las características de los diferentes plásmidos empleados y construídos en el presente trabajo

PLASMIDO	CARACTERISTICAS	REFERENCIA O PROCEDENCIA
pV1-120	subclona de Polio-contiene al gene de 2C	(Van der Werf y cols.,1981)
pSV-O-polio	genoma completo de Polio	(Pncus y Wimmer, 1986)
pGEM-4	sitio "polilinker"	Promega Biotec (proveedor)
pPSV-23	carece de la región P1 del genoma de Polio	(Tapia-Ramirez, J.,1989)
pV1-120-M1	subclona de Polio-mutación en el gene de 2C	Presente estudio
pSV-O-polio-M3	genoma completo de Polio mutación en 2C	Presente estudio

El jurado designado por el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó el presente trabajo de Tesis.

Dr. Carlos Fernandez T. Tutor	Dr. Gustavo Viniegra G. Asesor
Dr. Miguel Betancourt R. Asesor	M. en C. Concepción Gutierres Asesor

México, D.F.a _____