BENEMÉRITA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CENTRO DE QUÍMICA-INSTITUTO DE CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

"Producción de las proteínas recombinantes NS1 y NEP del virus de la influenza A H1N1 en *Escherichia coli*, purificación y obtención de anticuerpos monoclonales"

TESIS

PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS
Área Bioquímica y Biología Molecular

Presenta:

Q.F.B. Marbeht Maleni Martínez Castañeda

Directores de tesis:

Dra. en C. Irma Herrera Camacho. CQ-ICUAP

Dr. en C. Julio R. Reyes Leyva. CIBIOR-IMSS

PUEBLA, PUEBLA **Diciembre del 2017**

BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta, Dr. José Luis Cerriteño Sánchez, Dr. Fernando Esquivel Guadarrama, y el Dr. Gerardo Santos López, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **"Producción de las proteínas recombinantes NS1 y NEP del virus de la influenza A H1N1 en *Escherichia coli*, purificación y obtención de anticuerpos monoclonales"**, que presenta la alumna **Marbeth Maleni Martínez Castañeda** para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintisiete días del mes de noviembre del año dos mil diecisiete.

ATENTAMENTE

Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta

Dr. José Luis Cerriteño Sánchez

Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

Dr. Gerardo Santos López

Posgrado en Ciencias Químicas
Facultad de Ciencias Químicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio FCQ 10,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 7397
posgrado.quimica@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El siguiente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Parte de este trabajo se realizó en una estancia en el laboratorio de Inmunología Viral en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la tutoría del Dr. Fernando Esquivel Guadarrama. Periodo: 8 de mayo hasta el 7 de julio de 2017.

Para la realización de este trabajo recibí poyo económico de CONACYT, con el número de

CVU 697366

Agradezco a la Vicerrectoría de investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para conclusión de esta tesis. Dentro del programa II. Investigación y Posgrado. Aseguramiento de la calidad en el Posgrado. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2013-2017, con No de oficio (VIEP/3085/2017).

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis:

Dra. Irma Herrera Camacho
Dr. Julio Reyes Leiva

Por darme la oportunidad de ser parte de su trabajo de investigación y así poder continuar con mi formación académica. Por su tiempo, consejos y respaldo.

Al comité tutorial y revisor de tesis:

Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta
Dr. Gerardo Santos López
Dr. José Luis Cerriteño Sánchez
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

Por sus enseñanzas a mi formación académica; contribución para la realización de este trabajo. Por su tiempo y dedicación para la revisión de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Saber que el mejor maestro es la vida misma, pero que cuenta con herramientas para enseñarme me hace agradecer a muchas personas:

A mis padres: Flor Castañeda y Artemio Martínez

Por su trabajo, desvelo y esfuerzo para mi educación, pero sobre todo por "Creer en mí" cuando yo tuve mis dudas, espero en algún momento tener la experiencia que me han transmitido y ser uno de sus tantos orgullos.

A mis hermanos y sobrinos

Por su tiempo, su buen humor, estar a mi lado, y consentirme siempre.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de la BUAP y UAEM.

Por enseñarme que "la actitud que tomas ante las circunstancias es lo que te dará los resultados", la cual he aprendido observando que día a día ustedes se exigen más así mismos. A Lorena Cardona por estar presente desde el inicio de esta travesía, por apoyarme y brindarme su amistad.

Quizás no sea la persona más efusiva para expresar con palabras mis más sinceros agradecimientos pero quiero dejar plasmado lo importante que han sido para mí en esta etapa de mi vida profesional y personal.

Los quiero y agradezco

Atte.

Marbis

ÍNDICE

RESUMEN.....1

1. **INTRODUCCIÓN**..... 2

1.2 Virus de la influenza A. 3

1.3 Genoma viral..... 5

1.4 Corte y empalme de los segmentos genómicos virales..... 7

1.5 Ciclo replicativo..... 9

1.6 Respuesta inmune innata ante la infección viral… 11

1.7 Proteína no estructural 1 (NS1). 12

1.8 Proteína de exporte nuclear (NEP)..... 17

1.9 ANTECEDENTES..... 22

1.10 Proteínas recombinantes y Sistemas de expresión 23

1.10.1 Cuerpos de inclusión..... 25

1.11 Vectores que expresan NEP y NS1 26

2. **PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**..... 27

2.1 HIPÓTESIS..... 27

3. **OBJETIVOS** 28

3.1 OBJETIVO GENERAL 28

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES..... 28

4. **METODOLOGÍA**..... 29

4.1 Diagrama de trabajo. 29

4.2 MATERIALES MÉTODOS..... 30

4.2.1 Expresión de la proteína NEP y NS1 en *E. coli* BL21 (DE3) 30

4.2.2 Lisis celular. 30

4.2.3 Solubilización de cuerpos de inclusión con urea 30

4.2.4 Solubilización de cuerpos de inclusión con sarcosil. 31

4.2.5 Cromatografía de afinidad IMAC-NTA-Ni..... 31

4.2.6 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) e inmunodetección (Western-blot)..... 32

4.2.7 Determinación de proteínas por el método de Sedmak y Grossberg..... 33

4.2.8 Precipitación de proteínas 33

4.2.9 Cromatografía de exclusión molecular 34

4.2.10 Obtención de anticuerpos monoclonales 35
5. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN** 40
5.1 Expresión de las proteínas NEP y NS1 en *E. coli* BL21 41
5.2 Condiciones óptimas de expresión y producción de las proteínas NEP y NS1 en las cepas productoras de *E. coli* (BL21-NEP y BL21-NS1) 43
5.3 Proteínas recombinantes NEP y NS1 en cuerpos de inclusión 46
5.4 Solubilización de proteínas a partir de cuerpos de inclusión 48
5.4.1 Solubilización con urea 49
5.4.2 Solubilización con sarcosil 52
5.5 Purificación de la proteína recombinante NEP y NS1 por cromatografía de afinidad por inmovilización de metales (IMAC) 55
5.5.1 Purificación de la proteína recombinante NEP 57
5.5.2 Purificación de la proteína recombinante NS1 58
5.6 Purificación alternativa de NEP a partir del solubilizado proteico por cromatografía de exclusión molecular 61
5.7 Concentración de proteínas y rendimiento final proteico de IMAC-NTA-Ni 65
5.8 Producción de anticuerpos monoclonales anti-NEP y anti-NS1 66
5.8.1 Detección de NS1 y NEP mediante ensayo de ELISA 67
5.8.2 Obtención de anticuerpos anti-NEP y anti-NS1 en ratones 69
5.8.3 Obtención de hibridomas (fusión de células de bazo y de mieloma) 72
5.8.4 Detección de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-NEP 73
5.8.5 Determinación de especificidad de reconocimiento de los hibridomas 76
5.8.6 Obtención de clonas a partir de hibridomas 77
5.8.7 Determinación de clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-NEP mediante ELISA 78
5.8.7 Mantenimiento de hibridomas en placa y viales 79
5.8.8 Comprobación de clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-NEP mediante Western-blot 80
6. **CONCLUSIONES** 82
7. **PERSPECTIVAS DEL TRABAJO** 83
8. **REFERENCIAS** 84

LISTA DE FIGURAS

1. Estructura del virus de la influenza A……4
2. Esquema del genoma del virus de la influenza A……7
3. Procesamiento por corte y empalme de ARNm originado a partir del segmento 8 del genoma del virus de la influenza A……8
4. Ciclo replicativo del virus de la influenza A……10
5. Estructura dimérica de la proteína NS1……14
6. Estructura de la proteína NEP……18
7. Funciones de la proteína NEP……21
8. Vectores recombinantes que codifican para la proteína NEP y NS1……40
9. Expresión de las proteínas NEP y NS1 en *E. coli* BL21 (DE3), inducidas con IPTG a 1 mM por 15 h a 37 °C……42
10. Expresión de la proteína NEP en *E. coli* BL21 (DE3) bajo diferentes condiciones……44
11. Expresión de la proteína NS1 en *E. coli* BL21 (DE3) bajo diferentes condiciones……45
12. Presencia de NEP en cuerpos de Inclusión……47
13. Presencia de NS1 en cuerpos de Inclusión……48
14. Lisis celular y solubilización de NEP de cuerpos de inclusión, utilizando urea 8M……50
15. Lisis celular y solubilización de NEP de cuerpos de inclusión, utilizando urea 8 M……51
16. Solubilización de NEP en los cuerpos de inclusión con sarcosil……53
17. Solubilización de NS1 en los cuerpos de inclusión con sarcosil……54
18. Solubilización de NS1 en los cuerpos de inclusión con sarcosil……55
19. Purificación de NEP por cromatografía de afinidad (IMAC-NTA-Ni)……57
20. Precipitación por salado de la proteína NS1……59
21. Purificación de NS1 por cromatografía de afinidad (IMAC-NTA-Ni)……60
22. Curva de calibración de la columna de Sephadex G-75……63
23. Cromatograma de la elución de la proteína NEP de la columna de exclusión molecular……64
24. Purificación de NEP por columna de exclusión molecular G-75……65
25. Proteínas NEP y NS1 purificadas y concentradas……66
26. Detección de antígeno (NEP y NS1) por el método de ELISA con fosfatasa alcalina, búfer de fosfatos……68
27. Detección de antígeno (NEP y NS1) por el método de ELISA con fosfatasa alcalina, búfer de carbonatos y anticuerpos monoclonales comercial (anti-NS1)……69
28. Anticuerpos anti-NEP presentes en suero de ratones……71
29. Anticuerpos anti-NS1 presentes en suero de ratones……71
30. Hibridomas, producidos a partir de células SP2/0 y células de bazo de ratón inmunizado con la proteína recombinate NEP……73
31. Ensayo de ELISA para la detección de hibridomas productores de anticuerpo anti-NEP……74

32. . Ensayo de ELISA para la detección de hibridomas productores de anticuerpo anti-NEP (segundo pase)……..75
33. Especificidad de los hibridomas productores de anticuerpo anti-NEP (ensayo ELISA)……77
34. Clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-NEP……79
35. Detección de antígenos NEP por los anticuerpos monoclonales anti-NEP producidos…81

RESUMEN

La influenza estacional es una enfermedad respiratoria aguda viral altamente contagiosa, causada por el virus de la Influenza, el cual está compuesto de 8 segmentos de ARN en sentido negativo. El segmento 8 codifica para la proteína NS1 (no estructural 1), involucrada en la evasión de la inmunidad innata del hospedero; después de un corte y empalme del mismo segmento, codifica para la proteína NEP, la cual es mediadora en la exportación nuclear de los complejos de ribonucleoproteína viral (RNPv).

En trabajos precedentes en nuestro laboratorio se ha identificado que en células transfectadas con NEP (cepa pandémica A H1N1 2009), se produce un aumento en la síntesis de la proteína soluble TNF-α, existe un significativo aumento en la activad de su promotor en donde la región distal tiene un efecto potenciador, además que las vías de señalización por las cuales NEP tiene efecto sobre el promotor TNF-α son las MAPK y NF-κB. Para continuar con el estudio de las propiedades de NS1 y NEP a nivel celular e identificar los componentes proteicos que favorezcan la patogénesis viral es necesario contar con las proteínas puras, así como anticuerpos específicos.

Los objetivos del presente trabajo de tesis fueron producir las proteínas recombinantes NS1 y NEP del virus de la Influenza A H1N1 pmd09 en *E. coli*, purificarlas y obtener anticuerpos monoclonales.

Se trabajó con el sistema de expresión *E.coli* BL21 (DE3) el cuál fue transformado con el vector pQE-80L conteniendo las secuencias codificantes para las proteínas NEP y NS1 (pmd09), las cuáles presentan un motivo de 6 His en el extremo N-terminal y son inducibles con IPTG, produciendo las cepas recombinantes BL21-NEP y BL21-NS1.

Las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas para expresar ambas proteínas fueron a una temperatura de 37 °C, durante 6 h e inducción con IPTG 0.1 mM. Ambas proteínas se encontraron formando cuerpos de inclusión, por lo cual se solubilizaron con el detergente sarcosil utilizando 0.1% para NEP y 0.5% para NS1. Se realizó la purificación proteica a través de una columna de afinidad de inmovilización por iones (IMAC NTA-Ni) para ambas proteínas, eluyendo la proteína con imidazol 500 mM a pH=8.5 y obteniendo las proteínas puras, NEP (42.5 μg) y NS1 (52.5 μg) a partir de un cultivo de 25 ml de medio.

En el Laboratorio de Inmunología Viral de UAEM se realizó la obtención de anticuerpos monoclonales. En las condiciones ensayadas no se obtuvieron anticuerpos anti-NS1. Se detectaron anticuerpos anti-NEP en el suero de los ratones inoculados, por lo que se continuó con la producción de anticuerpos monoclonales fusionando células de bazo de ratones BALB/c (inoculados con el antígeno NEP) y células de mieloma. Se obtuvieron 4 clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-NEP. Se corroboró su reconocimiento antígeno-anticuerpo por medio de ensayos de ELISA y Western-blot.

1. INTRODUCCIÓN

El virus de la influenza es un patógeno respiratorio, sus hospederos naturales son las aves acuáticas; sin embargo, también infecta a humanos, cerdos, caballos y otras especies de aves [1]. En mamíferos, el virus entra al hospedero a través de la cavidad oronasal, cruza la barrera mucosa que recubre el tracto respiratorio superior antes de infectar células epiteliales, macrófagos y células dendríticas residentes en el epitelio, luego se puede dirigir hacia el tracto respiratorio inferior [2]. En humanos es la causa más común de dificultades respiratorias, siendo un serio problema de salud pública al originar epidemias estacionales y esporádicas pandemias resultando en una mortalidad y morbilidad significativa. Cada año nuevas cepas de influenza causan brotes estacionales resultando en más de 200,000 hospitalizaciones y aproximadamente 35,000 muertes en los Estados Unidos. La organización mundial de la salud (WHO) estima que existe 100 millones de infecciones anuales en el mundo, de las cuales 3 a 5 millones de casos son graves y entre 300,000 y 500,000 terminan en defunciones [3,4].

El impacto en la salud está determinado por el tipo de cepa viral y su capacidad para propagarse de un hospedero a otro (transmisibilidad) y su capacidad relativa para causar enfermedad (virulencia). Es un virus impredecible, nuevas cepas contra las cuales no existe inmunidad previa pueden surgir en cualquier momento. Lo relativo a estos virus es que a través de la adaptación o el reordenamiento de genes con otros subtipos de influenza podrían conseguir la capacidad para ser transmitidos fácilmente entre humanos e inducir una nueva pandemia [5].

El virus de la influenza A H1N1 causante de la pandemia española en 1918 infectó a una tercera parte de la población mundial, resultando de 50 a 100 millones de muertes aproximadamente, este virus tenía gran transmisibilidad y virulencia [6]. La llamada “gripa asiática” causada por un virus de influenza de subtipo H2N2 (1957) ocasionó la muerte de 1-1.5 millones de personas, y el subtipo H3N2 causante de la pandemia de Hong Kong en 1968 causó la muerte a

más de 750,000 personas [7]. En abril del año 2009 una nueva cepa de virus de influenza A de subtipo H1N1 surgió en México y Estados Unidos y se esparció rápidamente alrededor del mundo, declarándose el estado de pandemia por la Organización Mundial de la Salud el 11 de junio de 2009.

Teóricamente este virus pandémico, cuya nomenclatura más aceptada es virus de la influenza A (H1N1) pdm09, se generó por eventos de reordenamiento genético, entre distintas cepas virales de origen aviar, porcino y humano. El virus de la influenza A (H1N1) pdm09 posee seis segmentos de ARN provenientes de un virus de influenza porcino que emergió debido a un triple reordenamiento; este virus circuló entre la población porcina de norteamérica desde 1990 y ocasionó eventos esporádicos de infección en humanos. Los otros dos segmentos de ARN provienen de virus de influenza de origen porcino-aviar euroasiático. Se observó que fue el causante de cuadros atípicos de neumonía, fatales en ciertos grupos en riesgo [8], con una menor virulencia en comparación de otras cepas pandémicas como la H1N1 de 1918, pero con una mayor transmisibilidad [1]. El virus de la influenza A (H1N1) pdm09 ha seguido circulando entre la población mundial y en los años 2015 y 2016 fue el tipo de virus predominante. Esta es una cepa, relativamente más virulenta que la cepa estacional H1N1, se replica en títulos mayores y de manera más profunda en los pulmones causando lesiones más graves e induce mayores niveles de citocinas que las cepas estacionales [4].

1.2 Virus de la influenza A

El virus de la influenza A pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Está clasificado en subtipos dependiendo de las glicoproteínas de su superficie: hemaglutinina (HA, H) y neuraminidasa (NA, N). Actualmente se conocen 17 subtipos diferentes de hemaglutinina y 9 subtipos de neuraminidasa.

El virus de la influenza A posee una membrana lipídica de origen celular, que forma la envoltura viral, en donde se proyectan hacia la superficie la HA, NA y

la proteína de Matriz 2 (M2). Justo debajo de la envoltura se encuentra la proteína de Matriz 1 (M1) [1] (fig. 1).

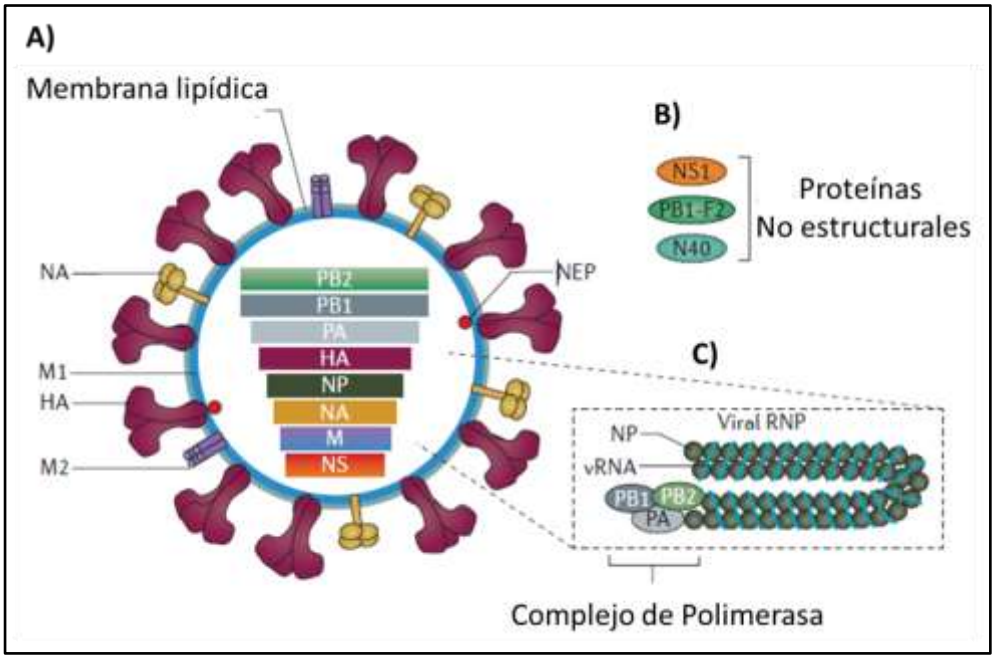


***Figura 1. Estructura del virus de la influenza A**. A) El virión consiste en una membrana lipídica que presenta tres glicoproteínas (NA, HA y M2) de superficie, asociada a ellas se encuentran las proteínas M1 y NEP, B) dentro del virión se encuentra el RNPv, constituido por ocho segmentos de ARN de una sola cadena de sentido negativo asociados a la polimerasa viral (PB1, PB2, PA) y protegidos por proteínas NP C) proteínas no estructurales (NS1, PB1-F2 y N40) (imagen tomada y modificada de [24]).*

La nucleocápside está integrada por un complejo ribonucleoproteico (RNP), el cual consiste en segmentos de ARN asociados a la nucleoproteína (NP), y la polimerasa viral que es un conjunto heterotrimérico formado por la Polimerasa Básica 1 (PB1), Polimerasa Básica 2 (PB2) y Polimerasa Ácida (PA) (fig.1-C) [9]. Asociada a este complejo también se encuentra la proteína de exportación nuclear (NEP), y se pueden encontrar también proteínas no estructurales como la proteína no estructural 1 (NS1) (fig.1-A, B).

1.3 Genoma viral

El genoma del virus de la influenza A está compuesto por ocho segmentos de ARN de una sola cadena en sentido negativo con un total de 13,588 nucleótidos [9]. El genoma viral codifica en total de 10 a 14 proteínas [2,10]. Cada segmento contiene regiones no codificantes en los extremos 5´ y 3´, los cuales son conservados (15 a 21 nucleótidos terminales) entre los virus de influenza A [11] (fig.2).

Los segmentos de mayor tamaño (1, 2 y 3) codifican para los componentes de la polimerasa viral PB1, PB2, y PA respectivamente. La ARN polimerasa dependiente de ARN es un complejo de 250 kDa compuesto por tres proteínas: PB1, que cataliza la adición secuencial de nucleótidos durante el alargamiento de la cadena de ARN y es la responsable de la unión al ARN genómico viral (vARN) y al ARN complementario (cARN), que sirve como molde para el inicio de la transcripción. PB2 participa en el inicio de la transcripción y es responsable de la unión a cap de los ARN premensajeros celulares. PA tiene actividad de endonucleasa, la cual se requiere para "robar" los extremos 5' de los mensajeros celulares que portan un cap y que se utilizan para la síntesis de los ARN mensajeros virales [12] (Fig.1-B).

El segmento número 4 viral codifica para la hemaglutinina, ésta es una molécula trimétrica, se encuentra proyectada hacia afuera del virión con su carboxilo terminal insertado en la membrana viral. Las funciones de HA son reconocimiento y unión específica a receptores celulares que contienen ácidos siálicos, la fusión endosoma-membrana celular y el ensamble vírico. La HA es el mayor determinante antigénico reconocido por el sistema inmune adaptativo del hospedero [13].

El segmento 5 codifica para la nucleoproteína, es una proteína estructural de unión al ARN viral, es el mayor componente en el complejo ribonucleoproteico, participa en la formación de los nuevos viriones [5,14].

El segmento 6 codifica para la neuraminidasa (NA), su función es separar interacciones entre ácidos siálicos presentes en la membrana celular y glicoproteínas virales, permite la liberación de virus nacientes y evita la agregación de partículas virales [15].

El fragmento 7 codifica para la proteína de matriz (M1/M2). M2 (originada a partir de un corte y empalme) es una proteína integral de membrana, es tetramérica. Contiene un ectodominio pequeño, un dominio transmembranal y uno citoplasmático. Posee una actividad de canal iónico, y su función es conducir protones para acidificar el interior del endosoma para ocasionar un cambio de conformación de la HA y propiciar la fusión de la membrana del endosoma con la del virus, lo cual disocia el complejo RNP del resto de los componentes virales [16]. M1 es la proteína más abundante en el virión, está involucrada en expórtación nuclear mediante la asociación a RNPs en el núcleo. Ya en la zona de ensamble viral hace contacto con la sección citoplasmática de las proteínas de envoltura a la vez que establece la unión con RNPs, Está compuesta por dos dominios globulares helicoidales [16].

Por último, el fragmento 8 codifica para las proteínas NEP/NS1, las cuales son motivo de estudio en este trabajo y las presentaremos más delante de forma extensa.

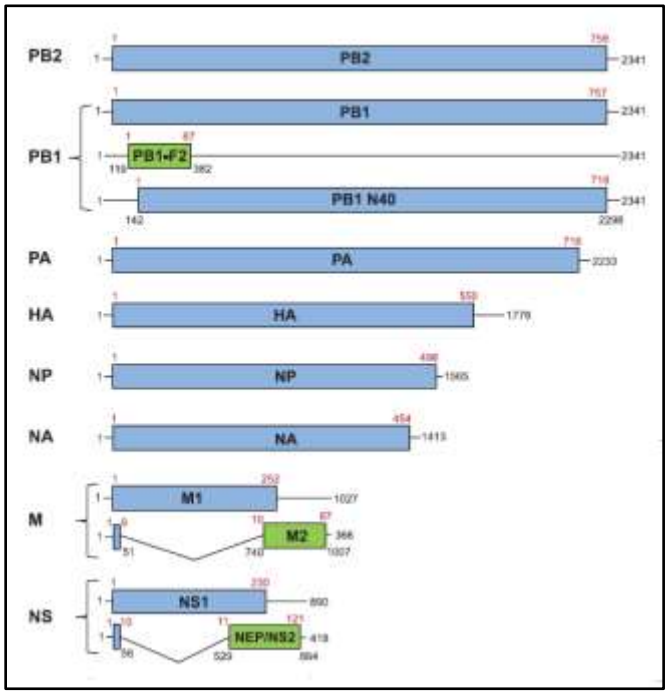


Figura 2. Esquema del genoma del virus de influenza A. *Las líneas en negro representan las regiones no traducibles 3´y 5´. Las cajas en verde representan las proteínas producidas por un marco de lectura alternativo y corte-empalme. En negro número de nucleótidos y en rojo el número de aminoácidos (imagen tomada y modificada de [16]).*

1.4 Corte y empalme de los segmentos genómicos virales

El virus de la influenza aumenta la capacidad codificante de su genoma por dos vías, corte-empalme y marcos de lectura alternativos (fig.2). Tres polipéptidos se producen por una transcripción alternativa, dos de estos polipéptidos son factores de virulencia originados de los segmentos 2 y 3 que originalmente codifican para las subunidades de la polimerasa viral PB1 y PA. PB1-F2 originado a partir del segmento 2 (87-90 a.a.) tiene múltiples funciones incluida la inducción de la apoptosis, regulación de la respuesta mediada por interferón, y modulación de la susceptibilidad del hospedero a una superinfección bacteriana. En adición a PB1-F2, el segmento 2 codifica para N40 que es una versión trunca del amino

terminal de PB1, todavía no se define su papel en la replicación viral. Se ha descrito el péptido PA-X que es producto de un cambio en el marco de lectura del fragmento 3 resultando en un polipéptido con un N-terminal correspondiente a PA [5]. PA-X promueve la degradación de ARNm elulares y la inhibición de la síntesis de proteínas celulares, además de ser un modulador de la respuesta inflamatoria del hospedero [2]. Los genes M y NS por medio de un corte-empalme y el uso de la maquinaria celular codifican para las proteínas M1/M2 y NS1/NEP (fig. 3) respectivamente [16, 5]. El segmento 8 del genoma viral contienen el marco de lectura de la proteína NS1 (fragmento no procesado) formado por 660 a 690 nucleótidos, y el marco de lectura de la proteína NEP (365 nt), es producida por corte y empalme de 471 nt del segmento 8 [17] (figura 3).

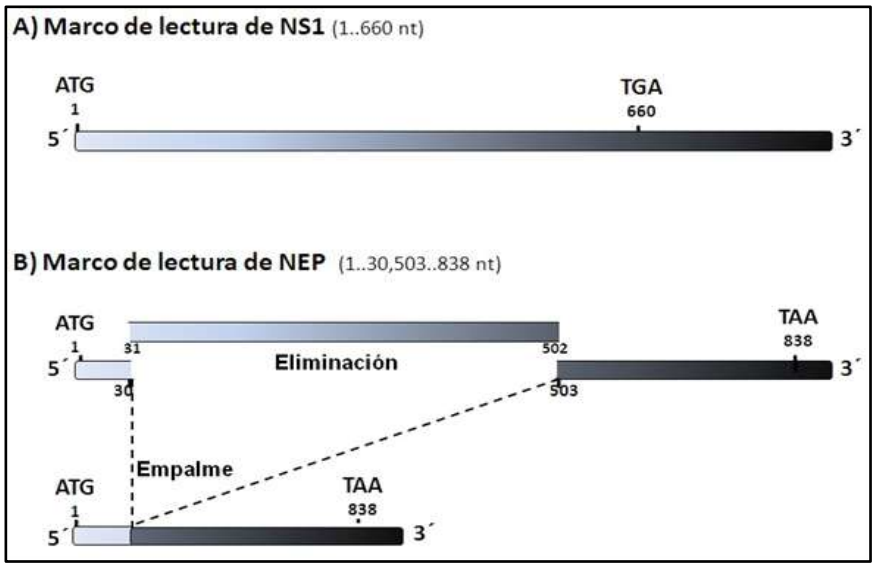


Figura 3. Procesamiento por corte y empalme del ARNm originado a partir del segmento 8 del genoma del virus de la influenza. *A) Marco de lectura de la proteína NS1 (fragmento no procesado) formado de 660 a 690 nucleótidos. B) marco de lectura de la proteína NEP (365 nt), producida por corte y empalme de 471 nt del segmento 8, (imagen tomada y modificada de [17]).*

1.5 Ciclo replicativo

El ciclo de replicación (fig. 4) comienza cuando las partículas virales se unen a receptores en la superficie celular. Los virus que infectan a humanos se unen preferentemente al ácido N-acetilneuramínico ligado a la penúltima galactosa por enlace α2,6 (NeuAcα2,6Gal), mientras que en aves a ácido neuramínico ligado en enlace α2,3 (NeuAcα2,3Gal). La tráquea humana contiene células epiteliales que presentan enlaces NeuAcα2,6Gal, mientras que el epitelio intestinal de patos posee enlaces NeuAcα2,3Gal [15,16].

Los cerdos contienen ambos tipos de enlaces receptores (NeuAcα2,3 Gal y NeuαAc 2,6 Gal), este animal puede ejercer el papel de reservorio de mezcla ya que virus aviares lo pueden infectar y desarrollar la habilidad (deriva viral antigénica) para reconocer los receptores NeuAc2,6Gal y entonces poder infectar a humanos [15,16]. También al coexistir una infección de cepas virales de diferente origen en una misma célula blanco se produce un reordenamiento genético originando un nuevo subtipo viral para el cuál el sistema inmunitario humano no tiene ningún tipo de defensa lo cual puede desencadenar pandemias.

Después de la unión virus célula, el virus es internalizado por endocitosis, la acidificación del endosoma (facilitado por M2) induce cambios conformacionales en la HA que permiten la fusión de la membrana viral con el endosoma liberando el genoma viral dentro del citoplasma y en M1 disociandola de las ribonucleoproteínas virales (vRNPs), esta disociación expone la señal de localización nuclear de NP que es reconocida por importinas celulares las cuales median el importe nuclear de vRNPs [18].

Posterior a la entrada al núcleo, la polimerasa viral inicia la transcripción de mensajeros virales (vARNm) mediante los cuales se sintetizan nuevas proteínas virales necesarias para la replicación de vARN. El proceso de replicación inicia por el robo de CAP mediante el corte de 5´CAP de ARN mensajeros celulares, subsecuentemente estos son usados como iniciadores para la copia del molde y finalmente son poliadenilados. La replicación viral ocurre en dos pasos: síntesis de

ARN complementario (cARN) de polaridad positiva que sirve como intermediario para generar grandes cantidades de vRNPs [19]. Los vRNPs son rodeados por la proteína de matriz M1, la cual es la proteína más abundante en el virión y a la vez se asocia a algunas copias de NEP [5, 20].

La formación de viriones ocurre en la membrana plasmática, así que los vRNPs tienen que cruzar la membrana nuclear hacia el sitio de ensamble [20]. Durante el ensamble viral las proteínas de envoltura HA y NA son transportadas a la membrana plasmática y asociadas con balsas lipídicas, M2 se localiza en la periferia de las balsas lipídicas. La proteína M1 no se asocia a las balsas lipídicas por sí misma, sino que interactúa con HA y NA por debajo de la membrana plasmática, M1 está también asociada al complejo vRNPs [21].

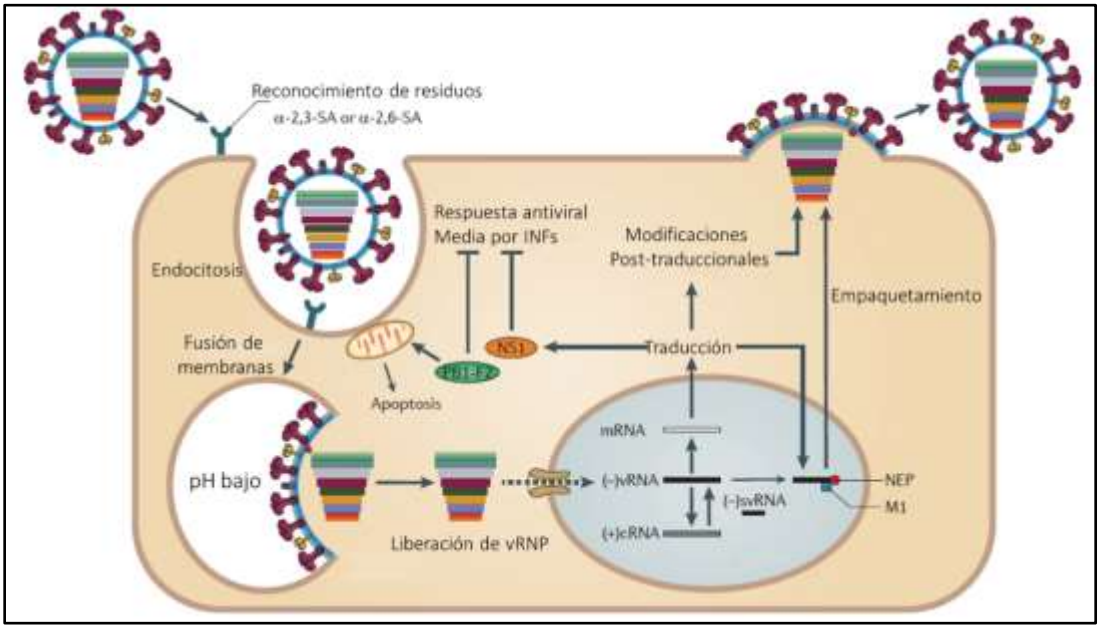


***Figura 4. Ciclo replicativo del virus de la influenza A**. El virus se une a receptores celulares mediante la HA que reconoce ácidos siálicos, entra a la célula por endocitosis, el pH del endosoma produce la fusión de membranas, el vRNP es liberado y transportado al núcleo donde se produce vARN, cARN y ARNm. Se realiza la síntesis de proteínas en el citoplasma y algunas de ellas sufren modificaciones post-traduccionales mientras que otras regresan al núcleo para transportar el vRNP hacia la zona de ensamble, las partículas son liberadas al medio extracelular (imagen tomada y modificada de [24]).*

La partícula viral sale de la célula hospedera por gemación y es liberada por la acción de la proteína NA, la cual desprende ácido siálico de los glicoconjugados de membrana. Se ha propuesto que se requiere de la actividad F1F0 ATP sintasa (complejo enzimático bifuncional, transporta iones a través de una membrana, produce ATP a partir de ADP y Pi, proporcionando energía para las diversas funciones celulares) para la eficiente formación y salida del virión, aunque el mecanismo de formación todavía no se conoce con precisión [22].

1.6 Respuesta inmune innata ante la infección viral

La respuesta inmune innata restringe la replicación del virus de la influenza A cuando ciertos patrones en su estructura molecular son reconocidos; estos componentes se denominan “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs) y son reconocidos en las células infectadas por “receptores de reconocimiento de patógenos” (PRRs), los cuales activan vías de señalización que inician la síntesis de interferones (IFNs) de tipo I y III, así como citocinas proinflamatorias.

Dependiendo en donde se encuentren expresados celularmente los PRRs detectarán ARNs viales ya sea si el virus falla durante la fusión y es degradado en el endosoma o durante la replicación del genoma viral cuando ARNs son transladados al citosol. En células inmunes innatas como macrofagos y neutrófilos PRRs pueden detectar dsARNs liberados por células muertas infectadas que fueron fagocitadas. Receptores similares al gen “toll” 3, 7, 8 (TLR3, TLR7 y TLR8) son expresados en endosomas de múltiples células presentes en la mucosa respiratoria. Los dsARN (bicatenario) virales son reconocidos TLR-3, que están presentes en células respiratorias epiteliales, macrófagos alveolares y células dendríticas (DCs). Los ssARN (monocatenario) virales son reconocidos por los TLR-7 y TLR8 presentes en monocitos, macrófagos y neutrófilos [23].

Los ARN virales también son reconocidos por sensores citoplasmáticos como el gen 1 inducido por ácido retinoico (RIG-I). El reconocimiento de TLR activa factores de transcripción como el factor regulatorio 3 (IRF3), NF-κB y el factor de transcripción 2 (ATF-2)/c-jun, que son responsables de la transcripción de los genes de interferón tipo I (IFN-α y IFN-β) y tipo III (IFN-λ) y citocinas proinflamatorias. Los IFNs actúan de manera autócrina y/o parácrina para inducir la expresión de cientos de genes estimulados por interferón (ISGs) que codifican proteínas con actividad antiviral [4, 23].

1.7 Proteína no estructural 1 (NS1)

La proteína NS1 se expresa abundantemente en células infectadas con el virus de la influenza A, es codificada a partir del segmento genómico 8 que también codifica para la proteína NEP; por tanto, ambas proteínas tienen la misma secuencia aminoacídica N-terminal (10 aminoácidos). Tiene una masa aproximada de 26 kDa, y puede estar compuesta por 217 a 237 a.a. [6]. En algunas variantes virales ocurre de manera natural un acortamiento de 15 a 30 a.a. en el extremo C-terminal de la proteína NS1. Cepas virales de subtipo H1N1 circulantes en los años 40 presentaban una proteína NS1 con una longitud de 230 a.a. debido a una ganancia de 7 a.a. originada por un solo cambio nucleotídico, este tipo de proteína NS1 estuvo presente hasta 1980 cuando las cepas H1N1 y H3N2 perdieron esos 7 a.a .debido a reversión a la secuencia original [26].

Estructura de NS1

Teóricamente se divide en dos dominios funcionales, un N-terminal de unión (residuos 1-73), el cual, *in vitro,* se une a dsARN (ARN de doble cadena), poliA y regiones snARN (ARN nucleares pequeños) [25]; y un dominio efector C-terminal (residuos 74-230) que interactúa con proteínas celulares. La dimerización es esencial para que el dominio de unión a dsARN sea funcional, este dominio

está formado por monómeros que consisten en tres hélices α. Los residuos básicos e hidrofóbicos de dos hélices idénticas en sentido antiparalelo de cada monómero contribuyen a formar el contacto con el esqueleto de polifosfato del ARN [26] (figura 5).

La proteína NS1 forma dímeros a concentraciones bajas (fig.5), a altas concentraciones se multimeriza. La dimerización de NS1 es esencial para sus funciones, al menos para la interacción con el dsARN. No existe evidencia de que esta proteína exista como monómero *in vivo*. G. Hale la describe como un homodímero dividido en cuatro distintas regiones, un dominio de unión a dsARN N-terminal (RBD), una región de unión (LR), un dominio efector (ED) y el C-terminal (CTT) [27].

La estructura cristalográfica del dominio efector en cepas humanas y aviares revelaron que las proteínas NS1 se homodimerizan independientemente, cada monómero consiste en siete láminas β y tres hélices α. Las láminas β forman una estructura torcida alrededor y a lo largo de la hélice α central; se han propuesto dos modelos de dimerización por medio de interacción hebra-hebra o hélice-helice [26]

Aun no se conoce la estructura de los 25 últimos aminoácidos de NS1, es posible que este tramo sea intrínsicamente desordenado y puede que solamente adopte una estructura ordenada en pro a la unión de un ligando. Se ha observado que el truncamiento o extensión en el C-terminal de NS1 puede modular la patogenicidad viral, ya que virus que presentan la eliminación de 28 a.a. inducen una respuesta antiviral mayor que la de virus que expresan la proteína NS1 completa [28]. Dentro de esta estructura desordenada se pueden distinguir cuatro residuos (ESEV o EPEV), que están presentes en cepas altamente patogénicas aviares y humanas, como la H1N1/1918 [29]; estos residuos tienen interacciones con varias proteínas celulares como la proteína de unión a poli A (PABPI) y proteínas con dominios PDZ (con funciones transportadoras, de ensamble o que forman complejos de señalización supramoleculares). La estructura completa de NS1 no ha sido determinada, puede que NS1 tenga varios estados diméricos

alternativos que ocurran de manera específica en cada cepa o de reconocimiento específico de proteínas [26].

La localización de NS1 es predominantemente nuclear, aunque es encontrada también en citoplasma. La nuclear es debido a la presencia de una o dos señales de localización nuclear (NLS) presentes en la estructura de NS1 por medio de la cual se realiza la importación nuclear activo vía unión a la importina-α. La localización citoplasmática es debido a que las proteínas NS1 recién sintetizadas permanecen en el citoplasma. También se ha reportado que posee una señal de exportación nuclear (NES). Es posible que exista una competencia entre estas secuencias NLS y NES, pero su presencia promueve la amplia distribución celular de NS1, que es esencial para realizar sus diversas funciones [26,30]. Se han propuesto al menos dos sitios de fosforilación en la molécula aún no confirmados experimentalmente [26].

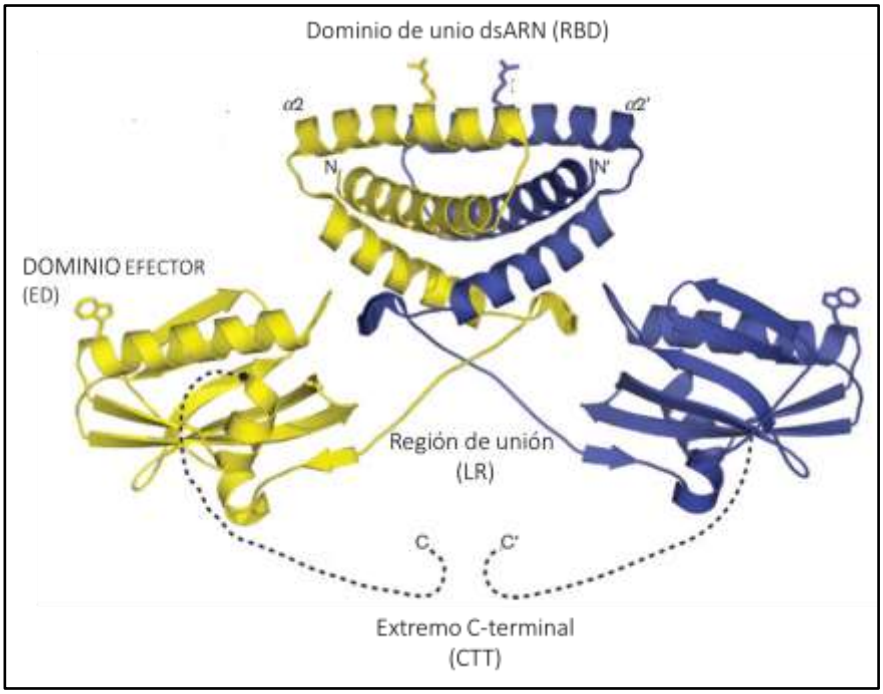


Figura 5. Estructura dimérica de la proteína NS1. *Se pueden distinguir 4 regiones, un dominio de unión a ARN amino terminal (RBD), un dominio efector (ED), una zona de unión entre los monómeros (LR) y un extremo carboxilo terminal (CTT) (imagen tomada y modificada de [27]).*

Funciones de NS1

En una infección el virus es detectado por células dendríticas, las cuales secretan citocinas, quimiocinas y migran a los nódulos linfáticos, donde presentan el patógeno a las células T citotóxicas (Tc) y T-cooperadoras (Th) para iniciar la respuesta inmune adaptativa. Las células Tc eliminan células infectadas por virus y las células Th aumentan la capacidad de eliminación mediante la producción de citocinas. Los IFN-α y IFN-β son citocinas solubles sintetizadas y secretadas por células en respuesta a la infección viral que actúan de manera autócrina y parácrina para inducir la síntesis de proteínas con actividad antiviral. La función principal de NS1 es antagonizar la respuesta inmune innata del hospedero, este proceso es específico de cada cepa [26].

Una gran cantidad de estudios han descubierto la capacidad de NS1 para limitar la inducción de IFN-β [1, 26]. Ensayos usando la proteína NS1 del virus Influenza A/Puerto Rico 1938 (PR8) demostraron que evita la transcripción de IFN-β, mediante la inhibición de los factores transcripcionales IRF-3, NF-kB y C-Jun/ATF-2, y forma complejos con RIG-I [6, 31]. La proteína NS1 de la mayoría de las cepas de influenza se une y secuestra a TRIM25, lo que inhibe la activación de RIG-1 y bloquea la activación de IRF3 [31]. NS1 inhibe la interacción del ADN con la maquinaria transcripcional e inhibe la transcripción de genes específicos; en células infectadas NS1 inhibe la ARN polimerasa II recubriendo la región promotora de IFN-β [3].

Aproximadamente 3000 genes son estimulados por IFN-α e IFN-β [23], entre ellos se encuentra el gen codificante para la proteína cinasa activada por dsARN (PKR), y la 2´-5´-oligoadenilato sintetasa (OAS) que activa a la ribonucleasa L (RNasa L) [32]. El complejo OAS/RNasa L se encarga de degradar el ARN de cadena doble y sencilla inhibiendo de esa forma la replicación viral. El dominio de unión de NS1 compite con la OAS para interactuar con el dsARN [26]. NS1 también compite contra PKR para evitar su unión al dsARN; además interactúa con PKR previniendo el cambio conformacional requerido para su auto inhibición, esto mantiene activa la síntesis proteica viral y celular [25, 31].

Se ha reportado que NS1 incrementa la traducción de ARNm virales en células transfectadas de manera dependiente al extremo 5´-UTR y por medio de la interacción con los factores de inicio eIF4GI y PABPI, pero que no afecta la transcripción viral [26]. En la cepa viral A/Udorn/1972 (H3N2) el dominio efector de NS1 se une directamente al factor específico de poliadenilación y corte (CPSF30) e interactúa con la proteína de unión a poli A (PABPII), este complejo inhibe el corte y poliadenilación del extremo 3´ de mensajeros celulares [26,31]. La cepa pandémica A/California/2009 (H1N1) y la altamente patógena A/Shanghai/1/2013 (H7N9) no interactúan con el factor CPSF30, es decir, la cepa pandémica H1N1pd09 es incapaz de inhibir la síntesis de proteínas del hospedero en células infectadas [2,6, 30].

NS1 inhibe el transporte citoplasmático mediante la unión al extremo 3' poli A de ARNm [25]. Se ha teorizado otro método causante de la retención de mensajeros celulares en el núcleo, mediante el cual, NS1 forma un complejo inhibitorio con la maquinaria de exporte nuclear, específicamente NXF1, p15, Rae1, E1B-AP5 y Nup98 [26].

Los factores pro-apoptóticos podrían promover la propagación eficiente del virus de la influenza. Algunas de las proteínas virales (NA y PB1-F2) tienen la capacidad de limitar la apoptosis en etapas tempranas de la infección, lo que promueve la replicación viral; mientras que aumentar la apoptosis puede incrementar la patogénesis viral. Se ha reportado que NS1 tiene ambas funciones: pro y anti-apoptótica. Durante la infección, NS1 tiene una clara función anti-apoptótica limitando los efectos inducidos por el interferón o por la inhibición directa de PKR y OAS que entre sus funciones tienen la de activar la apoptosis [26].

NS1 se une a la isoforma reguladora p58β y activa la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K); esto altera la síntesis de citocinas en células dendríticas, aumenta la transcripción de ARNm e inhibe la respuesta innata, además de promover la apoptosis [26].

Recientemente se han atribuido nuevas funciones a NS1, como la desregulación de la expresión de RhoA de una manera dependiente de NF-κB. RhoA es una GTPasa que controla diversas funciones celulares, incluidas la transcripción, la polimerización de la actina y la progresión del ciclo celular [33]. La vía de señalización hedgehog (Hh) tiene un rol central en el crecimiento y desarrollo, reparación del tejido y respuesta inmune de vertebrados e invertebrados, en estudios recientes se reportó que NS1 altera la expresión de genes blanco de Hh [10].

El virus de la influenza aviar A H5N1 de alta patogenicidad (dentro de las cuáles se encuentra A/Hong Kong/156/1997, H5N1) produjo seis casos fatales de 18 infecciones en humanos, se caracterizó por inducir niveles altos de diversas citocinas proinflamatorias (hipercitocinemia)especialmente TNF-α, causando el síndrome hemofagocítico. La replicación de A/Hong Kong/156/1997 (H5N1) fue resistente a efectos antivirales de IFN y TNF-α y para esta resistencia se requirió el ácido glutámico presente en la posición 92 de NS1 [26].

1.8 Proteína de exporte nuclear (NEP)

El octavo segmento genómico del virus de la influenza A sintetiza directamente dos ARNm, el primero codifica para la proteína NS1 y el otro derivado del procesamiento del ARN por corte y empalme es traducido a una proteína de 121 a.a. con un peso molecular de 14.5 kDa [34], la cual se localiza en el núcleo y originalmente fue llamada NS2, hoy llamada proteína de exportación nuclear (NEP) [5,9].

Estructura de NEP

Se pueden diferenciar dos regiones en la estructura de NEP, una sensible a proteasas en el N-terminal (1-54 a.a.) y otra resistente a ellas en la C-terminal (54-121) Al ser cristalizada se consiguió distinguir dos hélices-α, la C1, compuesta por

los residuos 64-85 y la C2, compuesta por los aminoácidos 94-115; mientras que los residuos 86-93 forman un giro entre las dos hélices (fig.6). Las dos hélices de igual tamaño son perfectamente antiparalelas, entran en contacto entre ellas por medio de 12 residuos hidrofóbicos y cuatro residuos polares, además interaccionan por puentes de hidrógeno. En la estructura cristalizada la cara hidrofóbica de la hélice C1 está hundida contra una hélice C2 de otra molécula de NEP formando un homodímero. Las interacciones entre los dos monómeros y la naturaleza hidrofóbica en la interface sugieren que el dímero observado no es meramente un artefacto de la cristalización [34].

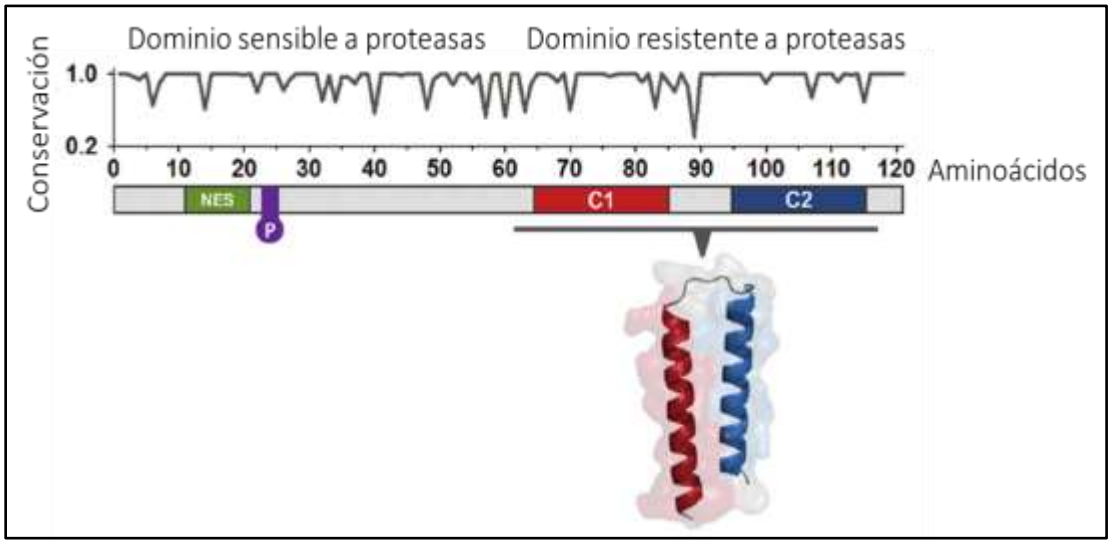


Figura 6. Estructura de la proteína NEP*. Señal de exporte nuclear 1 (NES) y zona de fosforilación presentes en el dominio sensible a proteasas de NEP (P). Estructura terciaria del dominio resistente a proteasas C-terminal (hélices C1 y C2) de NEP (imagen tomada y modificada de [5]).*

La composición aminoacídica de NEP es altamente conservada entre las cepas del virus de la influenza A que han sido secuenciadas (93.45%). La hélice C2 muestra el mayor porcentaje de conservación con 96.3% [5]. El extremo N-terminal de esta proteína presenta dos señales de exporte nuclear (NES1 y NES2), la primera de los aminoácidos 12-21 y la segunda de los residuos 31-40 [35].

También se ha expuesto que NEP sufre modificaciones postranscripcionales como la fosforilación en células infectadas (residuos altamente conservados S23 y S25), además de contener un blanco de SUMOilación (observado in vitro) [5,36].

Funciones de NEP

Por medio del sistema de doble-hibrido se encontró que NEP se une a nucleoporinas celulares y que puede remplazar funcionalmente el dominio Rev de VIH-1, cuya función es el transporte de material genético viral [37], además de que anticuerpos anti NEP bloquean expórtela exportación de vARN cuando es micro inyectado en el núcleo [34]. No se tiene evidencia de que NEP interactúe directamente con RNA viral [9], por medio de un ensayo de doble-híbrido y un fraccionamiento de partículas virales se ha identificado que interactúa con M1 por medio de un residuo de triptófano (W78) [5, 9, 37]. También ha sido reportado que los aminoácidos de carga negativa (residuos 81-100) son esenciales para la unión a M1 (región cargada positivamente), asumiendo que se tratan de interacción iónicas [38]. Utilizando mutantes de NEP, se ha realizado la reconstrucción *in vitro* de vRNP-M1-NEP y se mostró que M1 es incapaz de interactuar con vRNPs en el núcleo, que para esta interacción (vRNP-M1) es requerido el domino C-terminal de NEP, identificando que NEP es requerido para aumentar la unión entre M1 y vRNPs [20,39].

La proteína de mantenimiento de la región cromosómica 1 (CRM1) es la principal proteína de exportación que facilita el transporte de grandes moléculas, incluidas el ARN y las proteínas, a través de la membrana nuclear al citoplasma. CRM1 se une a la molécula que transporta a través de un pequeño péptido señal enriquecido en residuos de leucina (señal de exportación nuclear, NES) [40], y sólo se une a ella en presencia de Ran-GTP (proteína nuclear asociada a Ras implicada en el exporte nuclear de péptidos y proteínas). Existe evidencia de que el transporte de NEP es una molécula involucra la proteína CRM1, la alteración de NES1 de NEP no elimina la interacción con CRM1 pero si la formación del

complejo ternario (NEP-CRM1-Ran-GTP) resultando en la retención de ARNv. Mediante ensayos de doble hibrido se ha establecido que la eliminación de NES1 o NES2 no inhabilita la interacción de CRM1 con NEP, pero al eliminar las 2 secuencias no se observa interacción alguna entre estas dos proteínas [41].

Se han encontrado mutaciones en cepas del virus de la influenza circulantes, incluidas cepas del virus H1N1 pandémico capaces de aumentar la actividad de la polimerasa. Se ha demostrado que las hélices-α en el extremo C-terminal de NEP interactúan directamente con las subunidades básicas PB1 y PB2 de la polimerasa viral implicadas en la unión al promotor. Se especula que NEP se une a la polimerasa viral como un cofactor para estimular la replicación genómica viral [5], la eliminación de los tres últimos aminoácidos de NEP resulta en la pérdida de la capacidad para estimular la actividad de la polimerasa viral y la pérdida de la función de exportación nuclear, sugiriendo que estas actividades están relacionadas funcionalmente [20]. C. Roob y col. encontraron que NEP tiene un papel significativo en la regulación de la acumulación de vARN, ARNm, cARN viral, esta función es de gran importancia en la adaptación de los virus de la influenza aviar A H5N1 a células de mamífero, para permitir una replicación eficiente. Como la baja concentración de NEP estimula la acumulación de vARN y cARN, se propuso que NEP juega un papel crítico en la regulación del equilibrio viral ARNm:cARN en células infectadas. Es decir, que tiene el papel de interruptor del rol de la polimerasa viral que va de la transcripción en la infección temprana a la producción de vARNs a través del aumento de la síntesis de cARN (fig. 7) [5].

NEP contribuye al proceso de liberación viral a través de la interacción con la F1F0 ATP sintasa la cual consiste en una porción catalítica (F1) y un canal de protones (Fo); es un complejo enzimático encontrado en balsas lipídicas de la membrana plasmática en células de mamífero, esta proteína es crítica para la salida eficiente del virus [5]. La presencia de NEP en la zona de ensamble viral aumenta la densidad de la F1F0 ATP sintasa celular de igual manera en la zona de ensamble, resultando en la polimerización de esta ATPasa en las balsas lipídicas celulares, como resultado la F1F0 ATP sintasa puede eficientemente

causar una curvatura en el borde de la membrana plasmática celular provocando la formación de los viriones. El mecanismo energético y/o el gradiente de energía formado por la hidrólisis de ATP por F1F0 puede también ser necesitado para la gemación de la progenie viral [22] (fig.5).

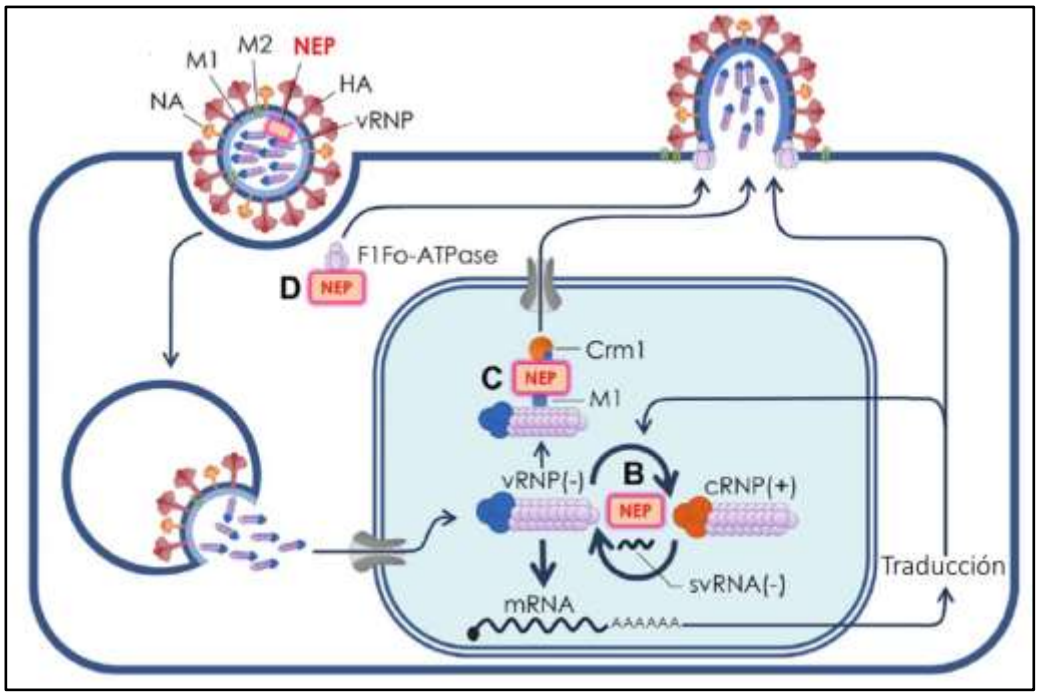


Figura 7. Funciones de la proteína NEP en la replicación viral*. NEP estimula la síntesis del intermediario cRNP que resulta en el incremento de la producción de vRPNs en la infección tardía. NEP interviene en el exporte nuclear por medio de la interacción de Crm1 y la proteína viral M1, la cual se asocia a vRNPs. NEP recubre a F1Fo ATP sintasa que está involucrada en la salida de la progenie viral, (imagen tomada y modificada de [5]).*

1.9 ANTECEDENTES

En nuestro grupo de trabajo del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la BUAP, en colaboración con el Centro de Investigación Biomédica de Oriente del IMSS, se han investigado las proteínas NS1 y NEP del virus de la influenza A H1N1. La tesis doctoral de A. Lara-Sampablo, en 2014, tuvo como objetivo explorar el papel de NS1 y NEP en la regulación de la expresión de TNF-α [17].

TNF-α tiene un rol relevante en la inducción y regulación de la respuesta inmune antiviral y es considerada una citocina con actividad antiviral. Sin embargo, los virus de la influenza aviar son capaces de replicarse en presencia de altas concentraciones de TNF-α en el medio de cultivo. Virus de la influenza de subtipo H5N1 inducen grandes cantidades de esta citocina en los pacientes, lo que contribuye a la severidad de la enfermedad. Pero la inducción de TNF-α no siempre está asociada con un fenotipo altamente patógeno.

Los resultados de esta investigación mostraron que en células transfectadas con NEP/pdm09 se inducia la biosíntesis de la proteína soluble TNF-α, la cual tendía a aumentar su concentración de 12 a 24 horas después de la transfección. Esta inducción no se observó con la transfección con NS1/pdm09 ni NS1/PR8.

Por medio de un ensayo en el que se utilizó el promotor del gen TNF-α acoplado al gen reportero de luciferasa se pudo identificar que en presencia de NEP/pdm09 la actividad de este promotor aumentaba significativamente. Al eliminar la región distal del promotor sólo se redujo un 15% la actividad, confirmando que este segmento es una región potenciadora e identificando que la actividad de NEP es realizada a través de algunos elementos de respuesta localizados en la región proximal del promotor. Varios trabajos han propuesto que al bloquear las vías de señalización Raf/MEK/ERK/NFκB, PKC o PI3K se reduce eficientemente la propagación del virus de la influenza. En el trabajo realizado [42] se observó que al bloquear la señalización Raf/MEK/ERK disminuye la actividad

del promotor en un 70%, al bloquear NF-KB se reduce en un 35%, así que las vías de señalización por la cual NEP/pdm09 tenía efecto sobre el promotor TNF-alfa eran las MAPK y NF-KB [17].

A partir de este trabajo hay nuevas preguntas por resolver, como conocer el mecanismo exacto por el cuál TNF-α es activado por NEP (probables interacciones de NEP/pdm09 con el promotor y factores de transcripción), así como el papel de NEP en la modulación de la respuesta inmune y en la patogenicidad del virus de la influenza.

Una de las formas para poder abordar a futuro estos estudios es tener por un lado las proteínas NS1 y NEP purificadas, así como obtener anticuerpos monoclonales anti-NS1 y anti-NEP.

1.10 Proteínas recombinantes y Sistemas de expresión

En la última década ha sido muy importante el desarrollo de la biotecnología, siendo la producción de proteínas recombinantes una rama que ha permitido obtener proteínas de interés purificadas a concentraciones elevadas en tiempos cortos. Así mismo, gracias a la ingeniería genética éstas proteínas recombinantes se pueden modificar antes de su producción ya sea poniéndoles etiquetas que las indentifiquen y/o faciliten su purificación, así como también fusionándolas con proteínas reporteras o de fácil detección [43,44].

Se tienen sistemas de expresión diversos: hospederos procarióticos como las bacterias, y hospederos eucarióticos como las levaduras y células de insecto. La utilización del hospedero dependerá del tipo de proteína recombinante que se requiera producir. La bacteria no tiene mecanismos para modificaciones post-traduccionales como la glicosilación de proteínas, por lo que se utiliza cuando la proteína recombinante que se requiere no es una glicoproteína.

Los sistemas procariontes son generalmente más sencillos de manipular y satisfactorios para la mayoría de los procesos. Entre los hospederos procarióticos

comúnmente utilizados se encuentra: *Escherichia coli, Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium.*

E.coli es un bacilo corto gramnegativo y es uno de los hospederos bacterianos para la producción de proteínas recombinantes más importante, cuenta con las ventajas de que su genoma es conocido completamente, lo que amplía considerablemente las posibilidades de su manipulación genética; existe amplio conocimiento sobre su fisiología y metabolismo y puede crecer rápido en medios muy simples. Se tienen también un conjunto de cepas de *E.coli* con mutaciones y modificaciones para optimizar la producción de proteínas recombinantes [45].

Cerca del 30% de las proteínas de uso terapéutico son producidas en *E.coli*, entre ellas se encuentran: la hormona del crecimiento humano, la hormona paratiroidea humana, la toxina de la difteria, la toxina pertusis, interferones, insulina humana y análogos, activador del tejido del plasminógeno, entre muchas otras [51].

Para producir una proteína recombinante la pauta de lectura del gen de la proteína se inserta en un vector de expresión. Se tienen varios vectores bien establecidos para la producción de proteínas recombinantes, ellos varían en el número de copias del producto, el tipo de promotor y marcadores de selección.

El promotor a emplear debe ser cuidadosamente seleccionado con el fin de poder regular la intensidad de inducción, una expresión muy alta del gen heterólogo puede conducir a la formación de cuerpos de inclusión [44].

Entre los promotores comunes se encuentra el promotor Lac, este promotor se reprime en presencia de glucosa y se induce en presencia de lactosa o su análogo isopropil-tiogalactosido (IPTG). IPTG es un reactivo caro, por lo que su empleo se reduce fundamentalmente a las escalas de laboratorio y piloto [45].

Normalmente el vector de expresión contiene un gen que proporciona resistencia a antibiótico, esto permite emplear una presión de selección, dado que las células utilizadas son sensibles al antibiótico, asegurando que sobrevivan

únicamente las células que contienen el vector ya que debido a efectos de segregación, el vector puede perderse y las células libres del vector mueren al ser sensibles al antiobiótico [43,44].

1.10.1 Cuerpos de inclusión

La alta temperatura, concentración de inductor durante la expresión proteica y un sistema promotor fuerte resulta en una alta taza traduccional de la proteína recombinante. La elevada cantidad proteica parcial o completamente desnaturalizada produce la agregación peptídica produciendo la formación de cuerpos de inclusión (Estos son agregados insolubles de proteínas, su tamaño varía entre 0,2–0,6 mm). A pesar de que la recuperación de proteínas bioactivas recombinantes a gran escala a partir de estos segregados ha sido uno de los mayores desafíos biotecnológicos ya que requiere de pasos adicionales para su recuperación, solubilización, replegamiento y purificación, pueden ser una ventaja para la purificación de proteínas [45].

Aparte de contener las proteínas de interés los cuerpos de inclusión suelen incluir proteínas membranales, así como ARN bacterianos. Inicialmente para recuperar los cuerpos de inclusión es necesario realizar la lisis celular con agentes químicos o métodos físicos y realizar lavados repetidos con detergentes para eliminar al máximo la contaminación proteica [45].

Para recuperar las proteínas de interés de estos cúmulos usualmente se manejan métodos desnaturalizantes como la urea o hipocloruro de guanidina, al utilizar estos comúnmente es necesario agregar un paso metodológico más para la renaturalización proteica. Otros métodos más suaves utilizados es el pH básico, la presión hidrostática y disolventes orgánicos, con ellos la molécula proteica no es completamente desnaturalizada. Otro grupo de agentes como el sarcosyl (N-lauril sarcosinato de sodio) y el DMSO (dimetilsulfóxido) son agentes no

desnaturalizantes los cuales tienen la ventaja de evitar el uso de métodos de replegamiento [45].

1.11 Vectores que expresan NEP y NS1

Para la producción de las proteínas NEP y NS1 de Influenza la A H1N1 precedentemente en el laboratorio se clonó el marco de lectura codificante para las proteínas NS1 y NEP en el vector pQE-80L, originando los vectores pQNEPpdm09 y pQNS1pdm09 respectivamente. El vector pQ-80L es un vector bacteriano LacIq (inducible con IPTG) de alto número de copias que expresa la proteína recombinante con un motivo de 6 His en el extremo N-terminal, tiene un gen para codificar β-lactamasa que lo hace resisten a la ampicilina. Estos vectores fueron insertados en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli,* la cual es sensible a la ampicilina, tiene la característica de carecer de las proteasas Lon y Omp-t lo que reduce considerablemente la degradación de la proteínas recombinantes dentro de la bacteria, produce bajas cantidades de acetato (subproducto metabólico altamente indeseable), obteniendo las cepas BL21-NEP y BL21-NS1 productoras de las proteínas recombinante NEP y NS1 de 15 kDa y 26 kDa respectivamente, ambas con un motivo de 6 His.

Las construcciones de los vectores y la transformación de las cepas fueron llevadas a cabo por Alejandra Lara Sampablo y José Luis Cerriteño Sánchez, anteriormente estudiantes de doctorado de nuestro grupo de investigación.

2. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Para continuar con el estudio de las propiedades e interacciones proteína-proteínas, proteína-ADN, tanto de NS1 y NEP e identificar los componentes proteicos que favorezcan la patogénesis viral, por un lado es importante contar con un sistema de expresión que permita recuperar las proteínas en grandes cantidades (el uso de organismos procariotas a comparación de cultivos celulares o extracción proteica *in vivo* nos proporciona esta posibilidad), así como contar con herramientas de reconocimiento específico como lo son los anticuerpos monoclonales que a diferencia con los anticuerpos policlonales adquiridos comercialmente nos dan la ventaja de tener cantidades ilimitadas de anticuerpo con especificidades precisas.

Por lo que en el presente trabajo se producirán las proteínas recombinantes NEP y NS1 en *E. coli*, se purificarán a homogeneidad y se obtendrán anticuerpos monoclonales anti-NEP y anti-NS1.

2.1 HIPÓTESIS

Dado que las proteínas virales NS1 y NEP del virus de la influenza A H1N1 no son glicosiladas, se pueden producir exitosamente en *E. coli*, y una vez purificadas a homogeneidad se pueden comportar como antígenos para producir anticuerpos monoclonales anti-NEP y anti-NS1.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

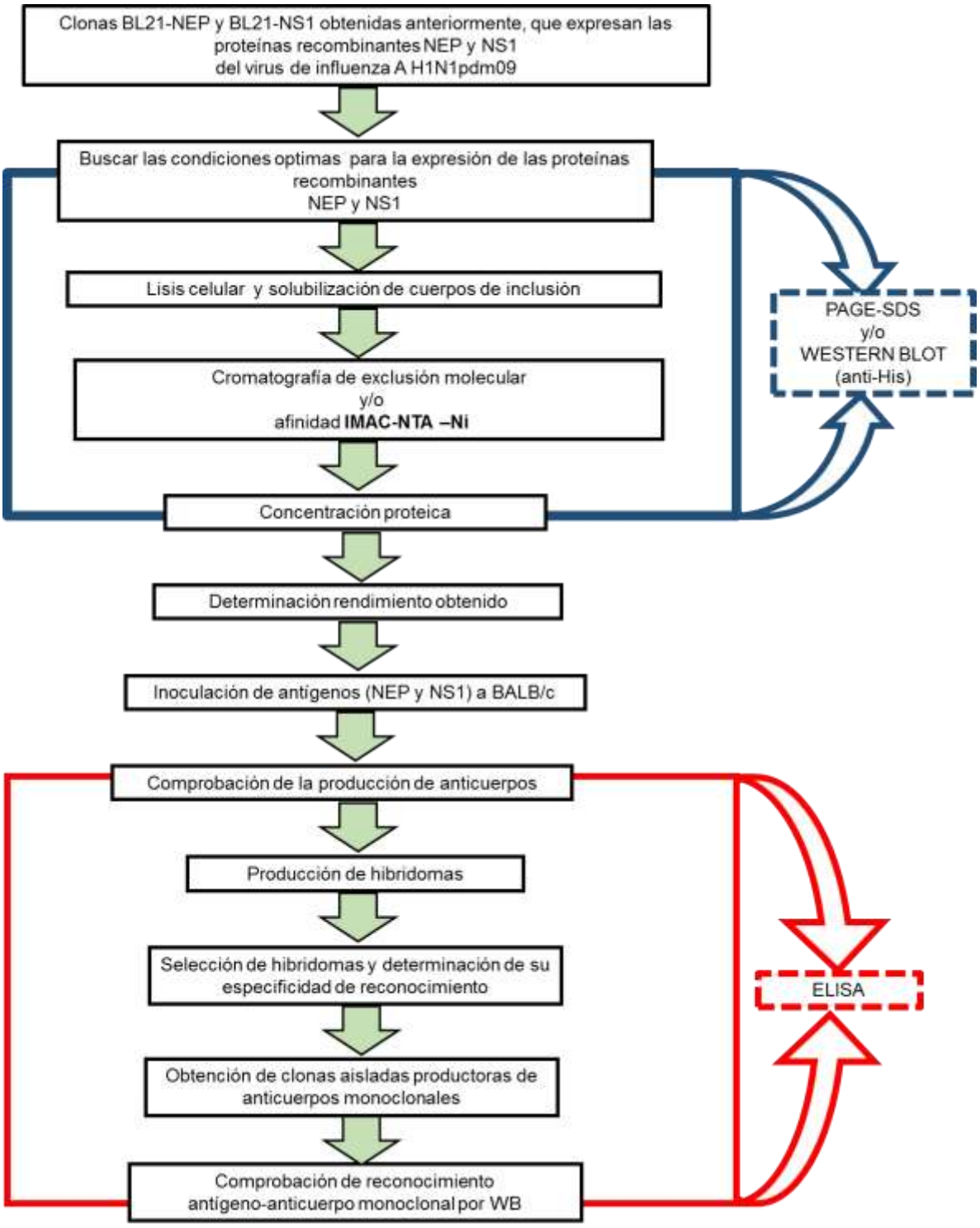
Producir las proteínas recombinantes NS1 y NEP del virus de la influenza A H1N1 en *E. coli*, purificarlas y utilizarlas como antígenos para producir anticuerpos monoclonales.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones óptimas de producción de las proteínas recombinantes NS1 y NEP del virus de la influenza A H1N1 en las cepas productoras *E. coli* BL21-NEP y BL21-NS1.
- Establecer las condiciones óptimas de extracción de las proteínas virales de los cuerpos de inclusión.
- Purificar las proteínas NS1 y NEP por cromatografía de afinidad por inmovilización de metales (IMAC).
- Obtener anticuerpos monoclonales anti-NS1 y anti-NEP.
- Corroborar la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos mediante ensayos inmunoenzimáticos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Diagrama de trabajo



4.2 MATERIALES MÉTODOS

4.2.1 Expresión de la proteína NEP y NS1 en *E. coli* BL21 (DE3)

Se inocula un precultivo de 3 ml de medio LB (10 g/l de peptona, 6 g/l de extracto de levadura, 10 g/l NaCl, pH 7.5 ± 0.05) con las cepas BL21-NEP y BL21-NS1 y 3 μl de ampicilina (100 mg/μl), se incuba por 16 h a 37 °C en agitación constante. A partir del precultivo se inoculan 25 ml de medio LB (cultivo) comenzando con una D.O. de 0.1 a 600 nm, se hace el seguimiento hasta una D.O. de 0.5 (aproximadamente 2 horas después). Inicialmente se trabaja con condiciones estándar: IPTG (1 mM) 15h, a 37 °C, posteriormente se trabaja con condiciones establecidas y optimizadas en este trabajo: IPTG 0.1 mM, 6 h, a 37 °C.

4.2.2 Lisis celular

Las células se recolectan por centrifugación a 8000 rpm por 10 min, el paquete celular se resuspende en 20 ml de agua y se centrifuga a 8000 rpm X 10 min, posteriormente el precipitado se resuspende en 5 ml de sacarosa al 20% en agitación (250 rpm por 10 min), se centrifuga a 8000 rpm por 10 min, al precipitado se agrega 5 ml de búfer A (Tris HCl 50 mM, pH 8), se realiza la ruptura celular con perlas de vidrio (1:2) (v/v) por 2 h en frío. Se filtra con gasa el lisado celular para separar las perlas de vidrio.

4.2.3 Solubilización de cuerpos de inclusión con urea

El lisado celular se centrifuga a 8000 rpm por 20 min, se resuspende el precipitado en 5 ml de tritón (X-100) al 1%, se agita a 250 rpm por 10 min y se centrifuga nuevamente en las mismas condiciones, al precipitado se le adicionan 5 ml de agua y se agita a 250 rpm por 10 min, se centrifuga a 8000 rpm por 20 min.

Al precipitado se le adicionan 5 ml de búfer B (Tris-HCl 50 mM, pH8, imidazol 30 mM, NaCl 300 mM) con urea 8 M y se agita a 250 rpm por 72 h en refrigeración. Se centrifuga a 8000 rpm por 20 min y trabaja con el sobrenadante (solubilizado).

4.2.4 Solubilización de cuerpos de inclusión con sarcosil

La lisis celular se centrifuga a 8000 rpm 20 min, se resuspende el precipitado con una pipeta en 5 ml de búfer B con sarcosil (N-lauril sarcosinato de sodio) 0.1% para NEP y 1 ml de búfer B con sarcosil al 0.5% para NS1, se centrifuga a 8,000 rpm y se trabaja con el sobrenadante (solubilizado).

4.2.5 Cromatografía de afinidad IMAC-NTA-Ni

Se utiliza la matriz NTA-Ni chelating-Sepharose (Amersham). Se monta la columna con 2.6 ml de matriz (VC) (columna con un radio de 0.75 cm y altura de 1.5 cm). Se activa con 0.2 VC de $NiCl_2$ 2 M, se reduce interacciones iónicas con 5 VC de NaCl 0.5M, se lava para eliminar el NaCl con 3 VC de H_2O. Se equilibra la columna con búfer B.

Se cargan 5 ml de muestra (solubilizado proteico de NEP o NS1) previamente filtrada (0.2 μm) y con una D.O. <2 a 280 nm, para evitar la saturación de la columna. Se tapa la columna y se deja en agitación lenta a 4 °C por 2 h. Se eluyen las proteínas contaminantes que no se pegaron a la columna, se lava la columna con 3 VC de búfer B resuspendiendo la resina para posteriormente dejar eluir el búfer B. Repetir el mismo paso de lavado por dos ocasiones más. Se pone 2 VC de búfer de elución (Tris-HCl 50 mM, pH8.5, imidazol 500 mM) y deja incubar en frío en agitación por 1 h. La proteína pura se recupera tras la elución del búfer.

La columna es regenerada por medio de la adición de 0.5 VC de EDTA (0.2 M), 2 VC de NaCl (0.5 M), 3 VC de H2O y saneada con 2 VC de NaOH (0.2 M) para ser almacenada con etanol (20%) en refrigeración.

4.2.6 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) e inmunodetección (Western-blot)

Las muestras a analizar se resuspenden en búfer de tratamiento reductor 1X (Búfer reductor 4X: 4 ml de glicerol, 0.8 g de SDS, 2 ml de β-mercaptoetanol, 2.5 ml de Tris-HCl 1 M pH 6.8, aforar a 10 ml). Se incuban en baño maría por 10 min a 100 °C, se cargan al gel de poliacrilamida (PAGE-SDS al 12%) se deja correr a 70 V por 30 min y al llegar al gel de separación se aumenta a 100 V por 2 h. El gel se revela con la solución de teñido (metanol 50%, ácido acético 10%, azul de Coomassie R-250 al 0.05%) por 1 o 2 h en agitación lenta. Se lava con la solución de desteñido (metanol 50%, ácido acético 10%) hasta tener bandas azules claras.

Para el Western-blot, después del corrimiento electroforético las proteínas del gel se transfieren a una membrana de fluoruro de polivilideno (PVDF). Previamente la membrana se trata 30 s con metanol, se lava con H_20 por 10 min. El gel y la membrana se incuban por 10 min en tampón de transferencia frío (1.5 g de Tris-base, 7.2 g de glicina, 100 ml de metanol, 0.5 g de SDS para 500 ml). Se colocan en el equipo de transferencia tres trozos de papel filtro húmedos en tampón de transferencia, sobre de ellos la membrana y posteriormente el gel, se cubre nuevamente con otros tres trozos de papel filtro humedecidos con el tampón de transferencia, se aplica un campo eléctrico (24 V, 0.3 A, por 50 min) para que las proteínas migren del gel a la membrana. Posteriormente se bloquea la membrana con 5% de leche descremada en TBS-Tw (Tris-HCl 20 mM, pH8, NaCl 0.15 M, Tween 20 al 0.05%), durante toda la noche en agitación suave, después la membrana se lava tres veces con TBS-Tw por 10 min cada una. La membrana se incuba con el anticuerpo primario (anti-His o monoclonales producidos) (1:5000 TBS-Tw -leche 5%) por 12 h, se lava nuevamente por 3 ocasiones con mismo búfer (10 min. cada una) y posteriormente se incuba con el anticuerpo secundario (anti-ratón para detectar motivos de histidinas y anti-IgG, IgM, IgA de ratón para los monoclonales) (1:6000 TBS-Tw-leche 5%) por al menos 4 h. La membrana se lava nuevamente y revela con el sustrato correspondiente, para HRP se usa el

sustrato quimio luminiscente Inmobilon (Millipore) y el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato y azul de nitrotetrazolio (BCIP-NBT) (promega) para fosfatasa alcalina.

4.2.7 Determinación de proteínas por el método de Sedmak y Grossberg

En este método se utiliza el colorante azul de Coomassie G-250, las proteínas forman un complejo proteína colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre, este método es sensible para detectar desde 1 μg de proteína.

El colorante azul de coomassie (0.06%) es solubilizado en ácido perclórico al 3% ya que en situaciones ácidas este se une a aminoácidos básicos [46]. Se prepara la curva de calibración con albúmina sérica bovina como indica en, al mismo tiempo se preparan las muestras por duplicado. Se mezclan con vórtex las soluciones y se determina la absorbancia a 620 nm. Las muestras analizadas son diluidas de tal manera que los valores de absorbancia a 620 nm estén dentro de la curva de calibración (100μl muestra /400 μl H_2O). Se grafica el valor de la absorbancia contra la concentración de albúmina para para obtener una curva que se corrige por regresión lineal con un coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0.9 y finalmente la concentración de las proteínas de las muestras se obtiene por interpolación en dicha curva.

4.2.8 Precipitación de proteínas

Precipitación con sulfato de amonio [47]

Para la precipitación escalonada a saturación con sulfato de amonio se agrega sulfato de amonio hasta una saturación de 30%, agregando la sal de manera lenta, agitación suave y en frío hasta disolver por completo la sal, después

de 10 minutos se centrifuga a 10,000 rpm por 20 min, el sobrenadante nuevamente es precipitado con la sal hasta el 60% de saturación, se sigue con la misma metodología para la disolución de la sal y la centrifugación, posteriormente el sobrenadante se lleva a una concentración de 90% de sulfato de amonio siguiendo la misma metodología. Los precipitados de cada centrifugación (30%,60% y 90%) se resuspenden 1/10 del volumen original y se dializa con búfer A por 12 h, con 2 cambios de búfer.

Precipitación con acetona

La precipitación con acetona en este caso solo es utilizada para concentrar proteínas a un volumen pequeño y poder ser cargadas a una electroforesis, ya que esta precipitación produce una desnaturalización proteica y una difícil resolubilización. Se toma 1 volumen de muestra y 9 volúmenes de acetona, se mezcla cuidadosamente invirtiendo los tubos y deja reposar a -20 °C por 2 h, agitando por inversión cada 30 min. Las muestras se centrifugan a 10000 rpm por 15 min a 4 °C. Se elimina la acetona mediante decantado y la pastilla se deja secar a temperatura ambiente; se suspende en 15 µl de búfer reductor 1X para PAGE-SDS al 12%, se incuba a 100 °C por 10 min y carga a gel de poliacrilamida.

4.2.9 Cromatografía de exclusión molecular

Con la resina de Sephadex G-75 (Sigma-Aldrich) se monta una columna de 0.75 cm de radio y 45 cm de alto (Bio-Rad) que contiene un volumen de gel de 80 ml con el búfer Tris-HCl 20 mM (pH8), KCl 100 mM y azida de sodio (NaN3) 0.02% como agente antimicrobiano. El flujo de la columna se controla mediante una bomba peristáltica a 10 ml/h. Primero se calibra la columna con proteínas de peso molecular conocido, graficando el logaritmo del peso molecular de dichas proteínas con el volumen de elución relativo de cada proteína (Ve/Vo) (Ve=volumen de elución, Vo=volumen muerto). El volumen muerto (Vo) se establece como el volumen necesario que fluye para la elución de una molécula

grande que no es retenida en la resina, en este caso se usa ferritina con un peso molecular de 440 kDa. Todas las proteínas utilizadas para la curva de calibración (albumina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica y citocromo C) se cargan en la columna a una concentración de 5 mg en 3 ml de búfer Tris-HCl 20 mM, pH8, KCl 100 mM, sorbitol 0.2 M y se analizan a 280 nm, gracias a la coloración rojiza del citocromo C [48] se puede corroborar su volumen de elución a una absorbancia de 460 nm. Ya con la columna calibrada, se carga el solubilizado proteico de los cuerpos de inclusión de NEP (2 ml con búfer Tris-HCl 20 mM, pH8, KCl 100 mM, sorbitol 0.2 M) y se recolectan fracciones de 2 ml en un colector de fracciones y posteriormente se determina la absorbancia de cada fracción a 280nm.

4.2.10 Obtención de anticuerpos monoclonales

4.2.10.1 Inmunización de ratones

Se trabaja con ratones de la cepa BALB/c de 6 semanas de nacidos provenientes del Bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM, en Cuernavaca Morelos. Por medio del sangrado de los ratones se obtiene el suero sanguíneo (sobrenadante de sangre periférica incubada por 15 min a 37 °C o a temperatura ambiente para favorecer la formación del coagulo y centrifugada por 15 min a 6,500 rpm) que se utiliza como control negativo de producción de anticuerpos.

Se prepara una emulsión con 60 µg de antígeno (NEP y NS1 respectivamente), 750 µl de PBS y 750 µl de adyuvante de Freund completo (Sigma) en agitación vigorosa por 45 min. Se inoculan 2 ratones (R-1 y R-2) por vía intraperitoneal con 500 µl de la emulsión con NEP (≈20 µg) y 2 ratones (R-3, R-4) de la emulsión con NS1 (≈20 µg).

Después de 12 días de vigilancia constante se realiza el segundo sangrado de los ratones obteniendo suero, y se realiza una segunda inmunización,

preparando una solución con 45 µg de antígeno en 300 µl de PBS y 300 µl de adyuvante de Freund incompleto emulsificados en agitación vigorosa por 45 min. Se inyecta 200 µl de la emulsión vía intraperitoneal a los ratones R-1 y R-2 con NEP (≈15µg), R-3 y R-4 con NS1 (≈15µg).

Después de 12 días se lleva a cabo un sangrado para la obtención de suero, y posteriormente una 3ª inmunización bajo el mismo procedimiento que la segunda inoculación. 12 días posteriores a la 3ª inmunización se realiza otro sangrado y obtención de suero sanguíneo con el que se realiza ensayos de ELISA para detectar la producción de anticuerpos. Se realiza una última inmunización con 15 µg de antígeno en PBS y 3 días posteriores se realiza la fusión celular.

Cada procedimiento se sigue de acuerdo con la "Guía del ciudadano para el cuidado y uso de animales de laboratorio de México" y aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y uso de Animales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se trabajó bajo el reglamento de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Estado de Morelos. Todos los procedimientos se hacen de acuerdo a la legislación mexicana NOM-062-ZOO 1999 basado en la Guía para el cuidado y uso de Animales de Laboratorio, NRC.

4.2.10.2 Protocolo de fusión de células SP2/0-bazo ratón 1 (r1)

MEDIOS DE CULTIVO

- RPMI +, suplementado con HAT

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	
RPMI		160 ml
Suero fetal bovino	20%	40 ml
Gentamicina (marca gibco 15750-060)	1 µg/ml	200 µl
2-mercaptoetanol	1 µg/ml	200 µl
Glutamina 100X	2 mM	2 ml
HAT (sigma H0262-1VL)	1 ml/50 ml	4 ml

- RPMIΘ (sin suero fetal bovino).

CELULAS DE BAZO

Después del último reto, el ratón 1 (inoculado con NEP), se sacrifica y obtiene el bazo en 10 ml de RPMI Θ, también se obtiene suero sanguíneo (sangrado final) utilizado como control positivo en los ensayos. El bazo se lava en medio RPMI Θ en repetidas ocasiones eliminando la presencia del adyuvante unido al tejido con la ayuda de pinzas estériles, se disgrega en una malla metálica y un émbolo de jeringa (condiciones estériles), y se centrifuga 5 min a 1250 rpm. Se adicionan 3 ml de NH_4Cl por 3 min a temperatura ambiente, se centrifuga y lava 2 veces con 10 ml RPMI Θ. Se resuspende con 5 ml de RPMI Θ y se cuenta el número de células con azul de tripano 1:1 (137 X 10^5 células de bazo/ml, total de 68.5 X10^6 células).

CÉLULAS SP2/0

Se centrifugan 50 ml de cultivo celular SP2/0 y se lava 2 veces con 20 ml de RPMI Θ. Se cuenta el número de células con azul de tripano 1:1 y se resuspenden en 5 ml de RPMI Θ (4.5 X 10^6 células SP2/0 /ml, total de 22.5 x10^6 células) y se guardan a 37 °C hasta la fusión.

FUSIÓN CELULAR

Se mezclan las células de bazo con las células SP2/0 a un radio de 3:1 (68.5 X 10^6 células de bazo: 22.5 X 10^6 células SP2/0). Se diluyen las células con 10 ml en RPMI Θ, se centrifugan 5 min a 1200 rpm, y adiciona al botón celular 1 ml de PEG/DMSO-10% (polietilenglicol/dimetilsulfóxido), previamente incubado a 37 °C mediante goteo y agitando muy suavemente, durante 1min. Se adiciona 2 ml de RPMI Θ /37 °C durante 2 min agitando cuidadosamente el tubo. Se adiciona 7 ml de RPMI Θ /37 °C durante 3 min agitando cuidadosamente el tubo. Se centrifuga por 5'/1200 rpm y se resuspende en medio RPMI + suplementado con medio HAT, se distribuye a una densidad de 1x10^5 células de bazo/pozo (200 µl) en 3 placas de 96 pozos, se incuba a 37 °C en atmosfera de 0.5 % de CO_2.

4.2.10.2 ELISA indirecto

Se colocan 500 ng de antígeno/pozo en 50 µl en búfer de carbonatos (Costar assay plate, alta adherencia, poliestireno 3366, 96 pozos), se deja incubar toda la noche a 4 °C, se lava 2 veces con 150 µl de PBS-Tw (1.4 g Na_2HPO_4, 0.24 g KH_2PO_4, 0.2 g KCl, 8g NaCl, Tween 20 al 0.05%) 0.05%, se incuba en PBS-Tw-Leche 5% libre de grasa por 2 h, a temperatura ambiente. Se lava 2 veces con 150 µl de PBS-Tw, se colocan 50 µl (1:200 en TBS-Tw-leche 5%) de anticuerpo primario, suero problema o sobrenadante celular (anticuerpos monoclonales) según sea caso, se incuba por 1 h a 37° C, se lava 4 veces con 150 µl de PBS-Tw. Se colocan 50 µl de anticuerpo secundario (cabra anti-IgG/A/M de ratón acoplado a fosfatasa alcalina 1:2000 en TBS- tween-leche 5%), (1:2000 en TBS-Tw leche 5%), se incuba por 1 h a 37 °C, se lava 4 veces con 150 µl de PBS-Tw, se añaden 50 µl de sustrato PNPP (para-nitrofenil fosfato) y dietanolamina al 0.1% (1:100), se deja incubar de 30 min a 1 h a 37° C y se mide a 405 nm.

4.2.10.3 Dilución límitante

- Se realiza un conteo celular con azul de tripano 1:1 de los hibridomas 2E2, 3F10 y 7.

Pozo	N° de células/ml
2E2	6.3×10^5
3F10	$7.5 X10^5$
7	$9.1X10^5$

Se toman 158 µl de 2E2, 133 µl de 3f10 y 109 µl de 7, y se lleva a un volumen de 1 ml de medio RPMI+ (concentración: $\approx 1x10^5$ cel/ml), se toman 100 µl de esta solución y se lleva a un volumen 1 ml de RPMI+ nuevamente (concentración $\approx 1x10^4$ cel/ml), de igual manera se realiza otra dilución a partir de ésta, con 100 µl para quedar a una concentración de $\approx 1x10^3$ cel/ml, se toman 100 µl de ésta y se lleva a un volumen final de 22 ml con una concentración final de

≈4.5 cel/ml, los cuáles son repartidos en placas de 96 (200µl /pozo) pozos con una concentración final de 0.9 cel/pozo.

4.2.10.5 Congelación de hibridomas y clonas en nitrógeno líquido

Congelamiento de placa

Se sustituye el medio de los cultivos celulares de la placa por medio fresco RPMI+, suplementado con HT y DMSO 10%, se disminuye la temperatura en hielo por unos minutos, se conserva en apel aluminio somete a congelación a -80 °C, unos días después se traspasa a tanque de nitrógeno líquido.

Congelación en viales

El cultivo celular se centrifuga a 1250 rpm por 5 min, se decanta y resuspende en 2 ml de RPMI, se hace conteo celular con azul de tripano (0.4%) 1:1, se realiza un cálculo para que se repartan las células en los viales de 1 ml con una cantidad de células entre $1X10^4$ y $1X10^7$. Las células se centrifugan nuevamente a 1250 rpm por 5 min, y se resuspenden en medio RPMI 70%, SFB 20% y DMSO 10% suplementado con HT (según los cálculos), se reparte en viales equitativamente. Se ponen en hielo unos minutos, posteriormente se llevan a congelación a -80 °C, su destino final es el tanque de nitrógeno líquido.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En trabajos precedentes en el laboratorio [17], se construyeron vectores incorporando el marco de lectura de la proteína NEP y NS1 del virus de la influenza A H1N1/pdm 09 en pQE-80L (figura 8). El vector pQE-80L tiene como marcador de selección al gen de resistencia a ampicilina y está bajo el control del operón Lac. El operón lac se activa por la presencia de un inductor (natural como lactosa o alolactosa, o sintético como el isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido IPTG). El IPTG tiene la ventaja biotecnológica de que no se metaboliza, por lo que su acción es constante y prolongada dando la oportunidad de inducir estas proteínas recombinantes mediante su adición única [43].

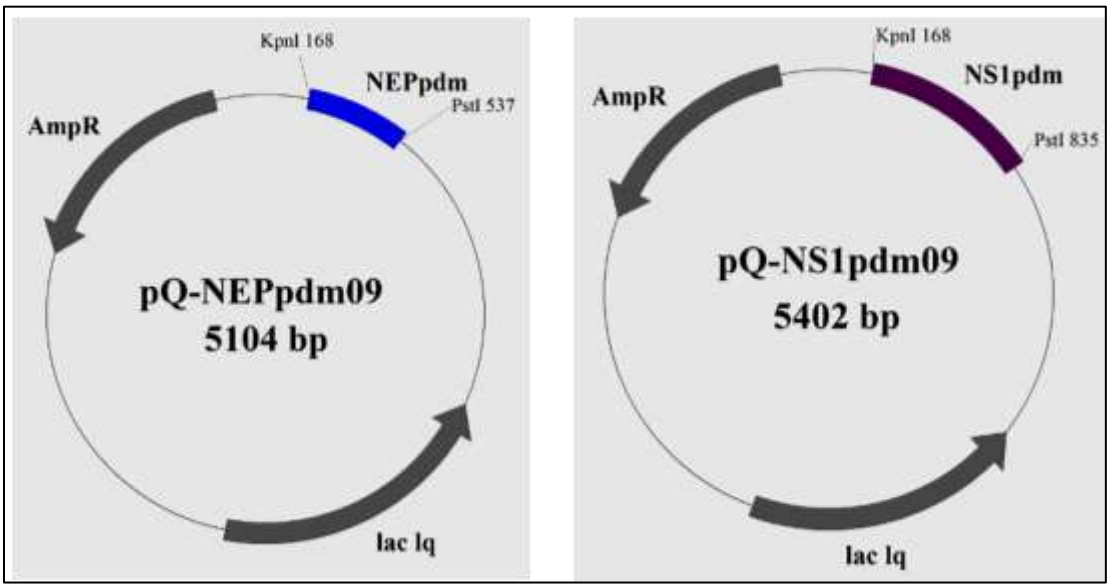


Figura 8. Vectores recombinantes que codifican para la proteína NEP (pQ-NEP pmd 09) y para la proteína NS1 (pQ-NS1 pmd 09), a partir del vector pQE-80L construidos por Alejandra Lara Sampablo, 2014)*, presentan una secuencia codificante para 6 His añadida bajo el promotor Lac, también presenta un gen de resistencia a ampicilina.*

El marco de lectura insertado en los vectores incluye una secuencia codificante que le añade un motivo de 6 histidinas (6X) en el extremo N-terminal de ambas proteínas, necesario para su detección por Western-blot y su

purificación por columna de afinidad (IMAC). Posteriormente, con los vectores construidos (pQ-NEP y pQ-NS1) se transformaron las cepas de *E. coli* BL21 (DE3), obteniendo las cepas productoras BL21-NEP y BL21-NS1 y comprobándose que producen las proteínas recombinantes NEP y NS1 respectivamente.

5.1 Expresión de las proteínas NEP y NS1 en E. coli BL21

En el presente proyecto se realizó la producción óptima de las proteínas virales en *E. coli* ya que es uno de los organismos que tiene una mayor velocidad de crecimiento a comparación de levaduras y células de mamíferos, crece en medios muy simples y con relativo bajo costo, además de que *E. coli* es una bacteria que no produce modificaciones post-traduccionales [44], eso es una ventaja ya que tanto la proteína NS1 como NEP son proteínas no glicosiladas. La cepa BL21 (DE3) es sensible a la ampicilina y carece de las proteasas Lon y Omp-t lo cual reduce considerablemente la degradación de las proteínas recombinantes dentro de la bacteria [43].

Con las cepas BL21-NEP y BL21-NS1 se realizaron cultivos comenzando con una D.O. de 0.1 a 600 nm, en los primeros minutos posteriores al inicio del cultivo incrementa la expresión de los genes importantes para el crecimiento; entre los 30 y 40 minutos se reinicia la replicación del cromosoma, así que se vigiló el cultivo hasta una D.O. de 0.5 (aproximadamente 2 horas) donde se presenta la primera división de la mayoría de las células y es posible inducir con IPTG ya que la expresión de los genes necesarios para el crecimiento disminuye y aumenta la de aquéllos relacionados con la viabilidad celular [49]. Se incubó el cultivo en condiciones estándar: 37° C, con IPTG 1 mM, por 15 h y agitación constante, esto para observar si las cepas BL21 (DE3) transformadas producían las proteínas de interés NS1 y NEP.

Se corrió un PAGE-SDS del lisado de de la cepa BL21-NS1 y BL21-NEP para corroborar la presencia de nuestras proteínas. En la figura 9-A se muestra la

expresión de una banda de alrededor de 26 kDa (carril1) correspondiente a la proteína NS1 y la expresión de la banda de 15 kDa (carril 2) de la proteína NEP, estas bandas no se observan en el control negativo, que es el lisado de la cepa original (carril 3).

El motivo de 6 His no afecta la estructura ni la función en proteínas recombinantes; sin embargo, si puede ser utilizado como un epítopo para la detección proteica [50], en la figura 9-B se muestra el Western-blot donde se identificaron las proteínas NS1 (carril 1) y NEP (Carril 2) utilizando anticuerpos anti-histidina, corroborándose que se trataba de nuestras proteínas de interés.

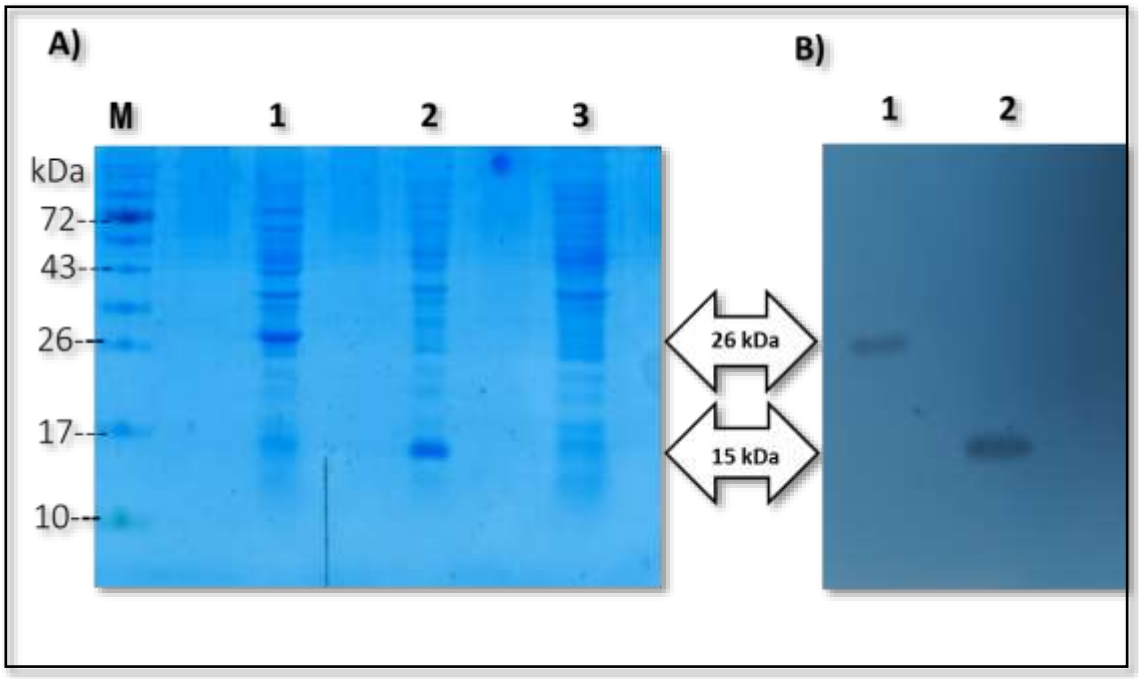


Figura 9. Expresión de las proteínas NEP y NS1 en E. coli BL21 (DE3), inducidas con IPTG a 1 mM por 15 h a 37 °C. A) *PAGE-SDS al 12 %,* ***B)*** *Western-blot (anti-His), M.-Marcador de peso molecular, 1.- BL21-NS1 (26 kDa), 2.- BL21-NEP (15 kDa), 3.- control negativo BL21.*

5.2 Condiciones óptimas de expresión y producción de las proteínas NEP y NS1 en las cepas productoras de E. coli (BL21-NEP y BL21-NS1)

Después de observar la presencia de las proteínas se llevó a cabo la búsqueda de las condiciones óptimas de expresión y producción de las proteínas virales, ya que la expresión y la solubilidad proteica puede ser optimizada por medio de la variación de las condiciones: la temperatura post-inducción, tipo y medio de cultivo, concentración del inductor, además el tiempo de inducción [51]. Con base en trabajos reportados de diferentes proteínas recombinantes producidas en *E. coli* [52] se decidió ensayar las diferentes condiciones de cultivo que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. *Condiciones para la producción de las proteínas NS1 y NEP.*

[IPTG] (mM)	Temperatura de incubación (°C)	Tiempo de incubación (h)
0.1	37	6
		10
		12
	27	10
		20
1	30	2
	Temperatura ambiente ≈20°C	10
		20
	37	15

Una vez obtenidos los cultivos bajo distintas condiciones se procedió a realizar un corrimiento electroforético con las células lisadas, tomando como control de producción de las proteínas recombinantes las condiciones previamente utilizadas (37 °C por 15 h, IPTG 1 mM).

La figura 10 muestra la expresión de la proteína NEP, se puede observar que a mayor tiempo de inducción (20 h) la proteína NEP casi no se expresa (carril

5) o son degradadas indicando que la expresión proteica depende del estado metabólico de la célula [51]. Al utilizar IPTG a 1 mM (carril 6,7,8) la cantidad de proteína era semejante que al utilizar una concentración 10 veces menor y menor tiempo de incubación (carril 1,2,3), contrastando con lo especulado ya que al disminuir la concentración de IPTG puede resultar una inducción ineficiente, pero si el inductor es agregado en exceso puede implicar en un efecto tóxico resultando en una reducción del crecimiento celular o concentración proteica [51]. Expresando con 0.1 mM de IPTG a 37 °C, con 6 h (carril 1) tenemos la misma expresión que con 10 h (carril 2), así como el control (carril 9), en el cual la concentración de IPTG es mayor (1 mM) y el tiempo de incubación también mayor (15 h).

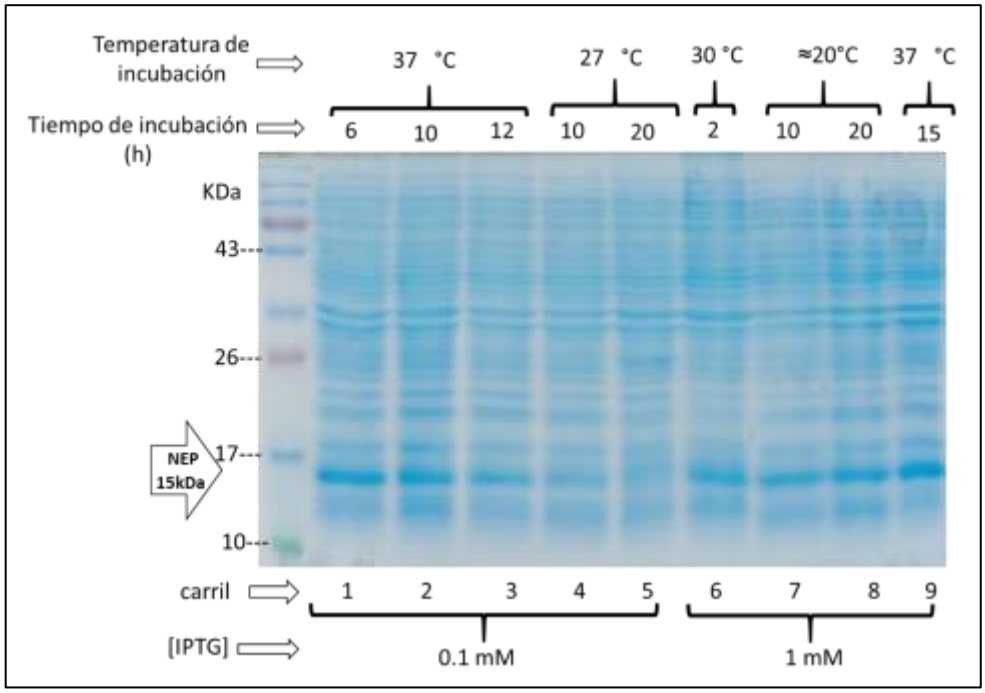


***Figura 10*. Expresión de la proteína NEP en *E. coli* BL21 (DE3) bajo diferentes condiciones.** *PAGE-SDS al 12%. M.- Marcador de peso molecular, 1-3.- Cultivo a 37 °C, IPTG 0.1 mM, 6,10 y 12 h respectivamente, 4-5.- Cultivo a 27 °C, IPTG 0.1 mM 10 y 20 h respectivamente. 6.- Cultivo a 30 °C, IPTG 1 mM 2 h, 7-8.- Cultivo a ≈20°C, IPTG 1 mM 10 y 20 h respectivamente. 9.- Control de producción proteico, cultivo a 37 °C, IPTG 1 mM, 15 h.*

En la figura 11 se muestra un corrimiento electroforético de la cepa BL21-NS1 inducidas bajo diferentes condiciones iguales a las realizadas con la cepa BL21-NEP, la banda de expresión a una altura de 26 kDa (perteneciente a NS1) en los carriles 1,2 y 3 que fueron inducidos con 0.1 mM de IPTG son de un grosor similar a los expresados con 1 mM (carril 6 y 9), a temperaturas más bajas (20 y 27 °C) la expresión es menor independientemente de la concentración de IPTG (carril 4,5,7,8).

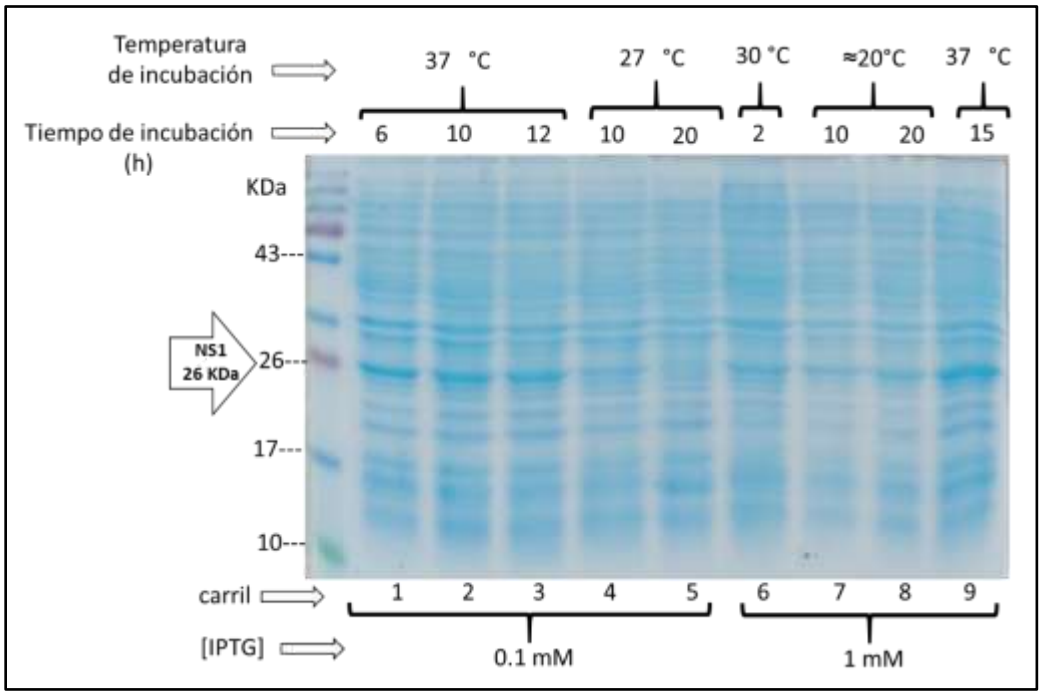


Figura 11. Expresión de la proteína NS1 en E. coli BL21 (DE3) bajo diferentes condiciones. *PAGE-SDS al 12% M.- Marcador de peso molecular, 1-3.- Cultivo a 37 °C, IPTG 0.1 mM, 6,10 y 12 h respectivamente, 4-5.- Cultivo a 27° C, IPTG 0.1 mM 10 y 20 h respectivamente. 6.- Cultivo a 30 °C, IPTG 1 mM 2 h, 7-8.- Cultivo a ≈20 °C, IPTG 1 mM 10 y 20 h respectivamente. 9.- Control de producción proteico, cultivo a 37 °C, IPTG 1 mM, 15 h.*

Con base en este estudio se determinó que las mejores condiciones para producir las proteínas son IPTG 0.1 mM, a 37 °C por 6 ó 10 h, tanto para NEP (fig. 10, carril 1 y 2), como para NS1 (fig. 11, carril 1 y 2).

5.3 Proteínas recombinantes NEP y NS1 en cuerpos de inclusión

La alta tasa de producción de proteínas recombinante en *E. coli* resulta en la agregación y acumulación en cuerpos de inclusión, los cuerpos de inclusión pueden ser observados en varios sistemas de expresión procariotas, su existencia en mayor o menor cantidad está determinada por la temperatura y el tiempo de incubación además de las características propias de cada proteína expresada [41].

Para observar en qué forma se encontraban las proteínas recombinantes NEP y NS1 se realizó un corrimiento electroforético de la fracción soluble y del precipitado de la lisis celular de los cultivos realizados en diferentes condiciones (tabla 1), ya que se ha demostrado que al disminuir la temperatura durante la inducción de la proteína, incrementa su concentración en el sobrenadante o fracción de proteínas solubles [52]. También la velocidad de crecimiento y la concentración del inductor además de influir en el nivel de expresión proteico, influye en la solubilidad proteica [44].

En la figura 12 podemos observar cómo al variar el tiempo de incubación, la temperatura y la concentración de IPTG observamos la proteína NEP de (15 kDa), presente casi en su totalidad en el precipitado (carril: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15), comparada con la fracción soluble (carril: 2, 4 , 6, 8,10, 12, 14). La nula variación de la intensidad de banda, que representan los cuerpos de inclusión al variar la temperatura se podría deber a que, aunque la velocidad de transcripción y traducción es menor a bajas temperaturas, la velocidad de plegamiento de la proteína es prácticamente la misma a 20 °C que a 37 °C [44].

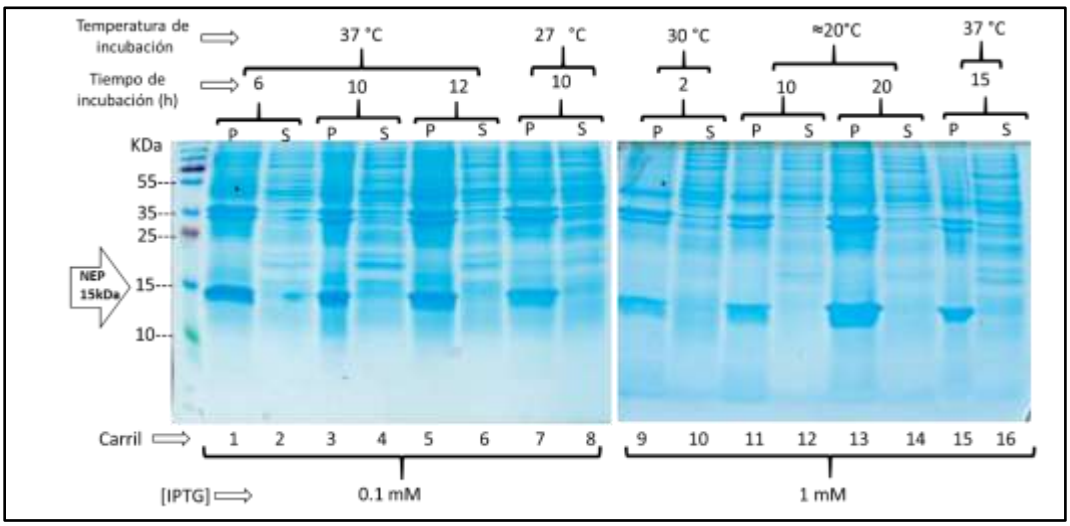


Figura 12. Presencia de NEP en cuerpos de Inclusión. *PAGE-SDS al 12% de la fracción soluble y precipitado celular de BL21-NEP, cultivos bajo distintas condiciones, P= precipitado, S = fracción soluble.*

Se realizó el mismo procedimiento para la proteína NS1, observando en la figura 13 que, en todas las distintas condiciones utilizadas, la mayor cantidad de proteína de interés, correspondiente a las bandas a una altura de 26 kDa, se encuentra presente en los precipitados (carril: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15).

Por medio de estos ensayos se determinó que las proteínas de interés NEP y NS1 al estarse produciendo en altas cantidades en las cepas BL21- NEP y BL21-NS1 se aglomeran formando los cuerpos de inclusión.

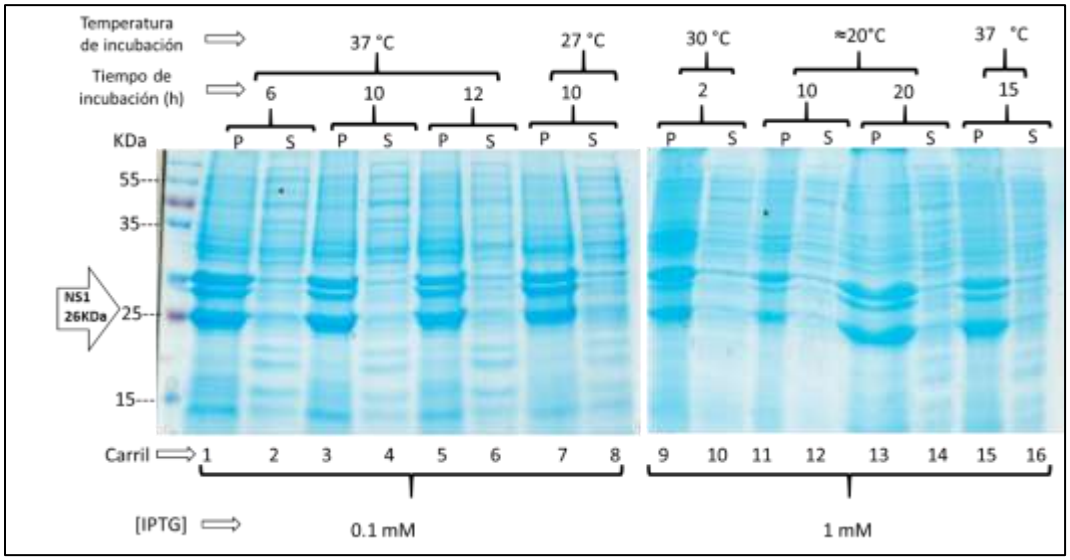


Figura 13. Presencia de NS1 en cuerpos de Inclusión. *PAGE-SDS al 12% de la fracción soluble y precipitado celular de BL21-NS1, cultivos bajo distintas condiciones, P = precipitado, S = fracción soluble.*

Si bien se conoce que hay factores como la fuerza del promotor y la temperatura con los que se puede controlar que la proteína recombinante se quede en las fracciones solubles y no en los cuerpos de inclusión [44], se decidió trabajar con los cuerpos de inclusión dado que las proteínas están aglomeradas ahí en altas concentraciones y así se evita un número mayor de proteínas contaminantes propias de la bacterias las cuales se encuentran en la fracción soluble, dificultando posteriormente la purificación de las proteínas recombinantes.

5.4 Solubilización de proteínas a partir de cuerpos de inclusión

Tanto la proteína NS1 como la NEP se encuentran en los cuerpos de inclusión (insolubles), el precipitado con el que trabajamos está formado por

cúmulos proteicos que aunque se encuentran en forma insoluble muchas veces significa la mejor forma de obtener grandes cantidades de proteína recombinante [43].

La solubilización de agregados proteicos se realiza comúnmente con: agentes caotrópicos (fuertes desnaturalizantes) como guanidina o urea a altas concentraciones (6-8 M); sales de tiocianato, detergentes como SDS o sarcosil y agentes reductores como (beta-mercaptoetanol y ditiotreitol) [53].

5.4.1 Solubilización con urea

En primera instancia llevamos a cabo una solubilización proteica mediante el uso de urea 8M, ya que era la técnica ya implementada anteriormente en nuestro laboratorio.

En la figura 14-A, carril 1, se pueden observar todas las bandas de las proteínas presentes en el lisado de la cepa BL21-NEP, con una banda intensa a una altura de 15 kDa pertenecientes a la proteína NEP. En el sobrenadante del lisado (carril 2) se puede observar una gran cantidad de proteínas bacterianas que no son de nuestro interés. El precipitado donde se encuentran los cuerpos de inclusión, se trató con Tritón X-100, que es un tensoactivo no iónico utilizado para recuperar proteínas de membrana, el cuál fue utilizado para seguir eliminando proteínas contaminantes (carril 3). Finalmente, el precipitado (cuerpos de inclusión lavados) fue tratado con urea 8M por 72 horas. En el sobrenadante recuperado están las proteínas solubilizadas de los cuerpos de inclusión, observando en el carril 4 un número mucho menor de bandas proteicas, teniendo una banda proteica de 15 kDa, correspondiente a la proteina NEP en su forma soluble. Para corroborar que se trataba de la proteína soluble se realizó un Western-blot con anticuerpos anti-His (fig.14-B), donde se puede observar la presencia de la proteína NEP en el lisado celular, parte de ella en la fracción soluble y los cuerpos de inclusión que fueron solubilizados con urea (carril 1,2 y 4 respectivamente).

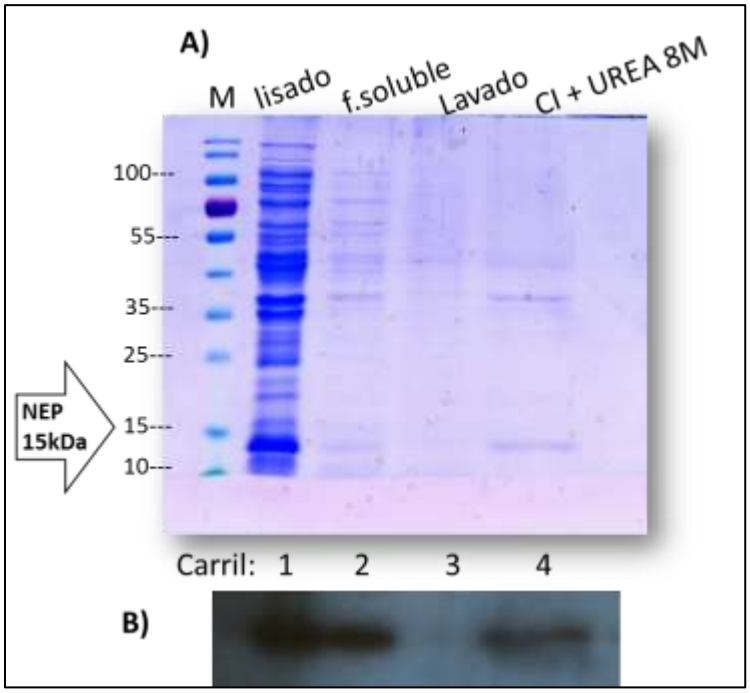


Figura 14. Lisis celular y solubilización de NEP de cuerpos de inclusión, utilizando urea 8 M*. **A)** PAGE SDS al 12%, **B)** Western-blot (anti-His), 1.- Lisis del cultivo con la cepa BL21-NEP, 2.- Proteínas solubles, 3.- Lavado de cuerpos de inclusión, 4.- Cuerpos de inclusión solubilizados con urea.*

Se realizó el mismo procedimiento para la proteína NS1. En la figura 15-A (carril 1) y se observaron todas las proteínas pertenecientes al lisado de la cepa BL21-NS1 con una banda de expresión proteica muy pronunciada a una altura de 26 kDa, masa molecular de la NS1. En el sobrenadante del lisado (carril 2), tenemos bandas de proteínas bacterianas solubles contaminantes y también una pequeña fracción de nuestra proteína de interés. En el lavado de los cuerpos de inclusión con Tritón X-100 (carril 3) hay bandas muy ligeras de mayor peso molecular. Al solubilizar los cuerpos de inclusión con urea 8M (carril 4), se observa una banda a 26 kDa, masa molecular de la NS1. Para corroborar que se trataba de la proteína NS1 soluble se realizó un Western-blot con anticuerpos anti-His (figura 15-B) observándose en todas las fracciones la presencia de la proteína NS1, siendo más intensa en el lisado (carril 1) y sobre todo en el tratamiento de los cuerpos de inclusión con urea (carril 4), logrando solubilizarla.

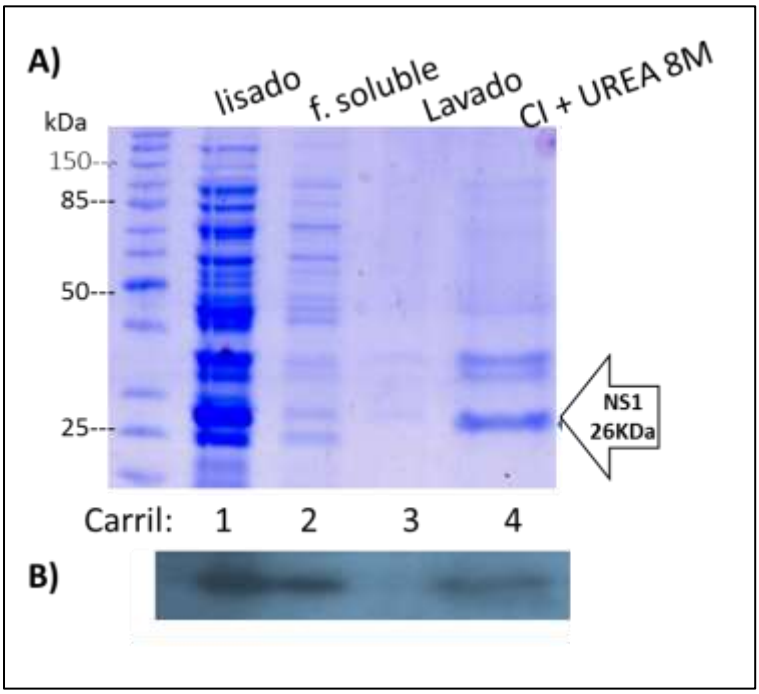


Figura 15. Lisis celular y solubilización de NEP de cuerpos de inclusión, utilizando urea 8 M. A) *PAGE SDS al 12%,* ***B)*** *Western-blot (anti-His), 1.- Lisis del cultivo con la cepa BL21-NS1, 2.- Proteínas solubles, 3.- Lavado de cuerpos de inclusión, 4.- Cuerpos de inclusión solubilizados con urea.*

Los rendimientos de la solubilización de proteínas con urea de los cuerpos de inclusión tanto de NEP como de NS1 fueron muy pobres, aunado a esto, para nuestras proteínas de peso molecular pequeño (15 y 26 kDa), la urea no permitió una interacción específica con la matriz de inmovilización por iones (IMAC) para la purificación. En algunos casos la urea afecta la estructura de la proteína y por tanto, su interacción con la resina utilizada en la purificación proteica por columna de afinidad por inmovilización con iones (IMAC) y posteriormente durante la remoción de la urea (disminución de la concentración de este agente por diálisis) la mayoría de las proteínas solubilizadas se agregaron y precipitaron nuevamente [52].

Con estos resultados, fue necesario buscar otras sustancias utilizadas para la solubilización de proteínas de los cuerpos de inclusión.

5.4.2 Solubilización con sarcosil

Otro detergente utilizado para la solubilización de proteínas es el detergente aniónico sarcosil, el cual puede extraer proteínas en forma nativa a partir de cuerpos de inclusión con buena eficiencia. Se ha reportado que con sarcosil al 10% se puede solubilizar hasta un 95% de cuerpos de inclusión, sin embargo, hay que buscar condiciones menores al 10% de sarcosil ya que también este detergente puede interferir en procesos de purificación por IMAC [54,55].

Se llevaron a cabo las solubilizaciónes de proteínas de los cuerpos de inclusión con diferentes porcentajes de sarcosil. Precipitados de la lisis celular de la cepa BL21-NEP y BL21-NS1 se resuspendieron en búfer de TRIS-HCl 50 mM (pH8), con 0, 0.1 y 1% de sarcosil, respectivamente. Se centrifugó la solución y se realizó un corrimiento electroforético de ambas fracciones: el precipitado y el solubilizado.

En la figura 16 se muestra el corrimiento electroforético para la proteína NEP, teniendo en nuestro control sin sarcosil (fig. 16-A) la banda intensa de NEP de 15 kDa en el precipitado (carril 3) y no en la fracción soluble (carril 2). Cuando se resuspendieron los cuerpos de inclusión con 0.1% y 1% de sarcosil (fig.16-B), se observaron bandas muy claras de la NEP en la fracción soluble (carril 1 y 3), y no en el precipitado (carril 2 y 4). Por otro lado, también se observó que hay proteínas bacterianas de peso molecular entre 25 y 35 kDa que se quedan en el precipitado (carril 2 y 4) las cuales no se solubilizaron con sarcosil (carril 1 y 3), lograndose eliminar estas proteínas contaminantes en este paso.

Con este experimento pudimos determinar que las mejores condiciones de solubilización de NEP de los cuerpos de inclusión fue con 0.1% de sarcosil.

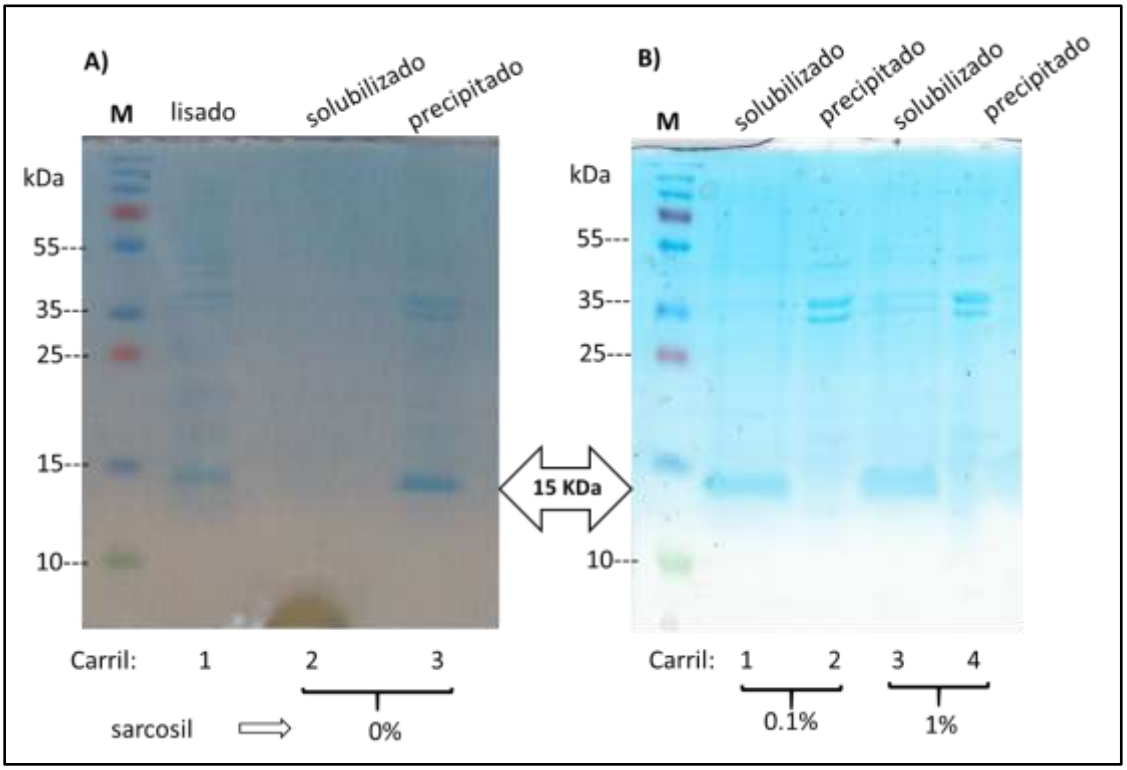


Figura 16. Solubilización de NEP en los cuerpos de inclusión con sarcosil.

A) *control para NEP, 1.- extracto total, 2.- sobrenadante con búfer de solubilización sin sarcosil, 3.-precipitado,* ***B)*** *Tratamiento de los cuerpos de inclusión con sarcosil, 1.- Sobrenadante solubilizado con 0.1 % de sarcosil, 2.- precipitado con 0.1% sarcosil 3.- sobrenadante con 1% de sarcosil, 4.- precipitado con 1% de sarcosil.*

Con respecto a la proteína NS1, la figura 17 nos muestra los corrimientos electroforéticos, teniendo en nuestro control sin sarcosil (fig. 17-A) la banda intensa de NS1 de 26 kDa en el precipitado (carril 3) y no en la fracción soluble (carril 2). Con respecto a la solubilización con sarcosil (Fig.17-B), observamos que con 0.1% la proteína no se solubilizaba en un 100%, teniendo la banda de NS1 de 26 kDa tanto en el solubilizado (carril 1) como en el precipitado (carril 2) y solo al aumentar el sarcosil al 1% la proteína se solubilizaba en casi en un 100% (carril 3) sin observar banda en el precipitado (carril 4).

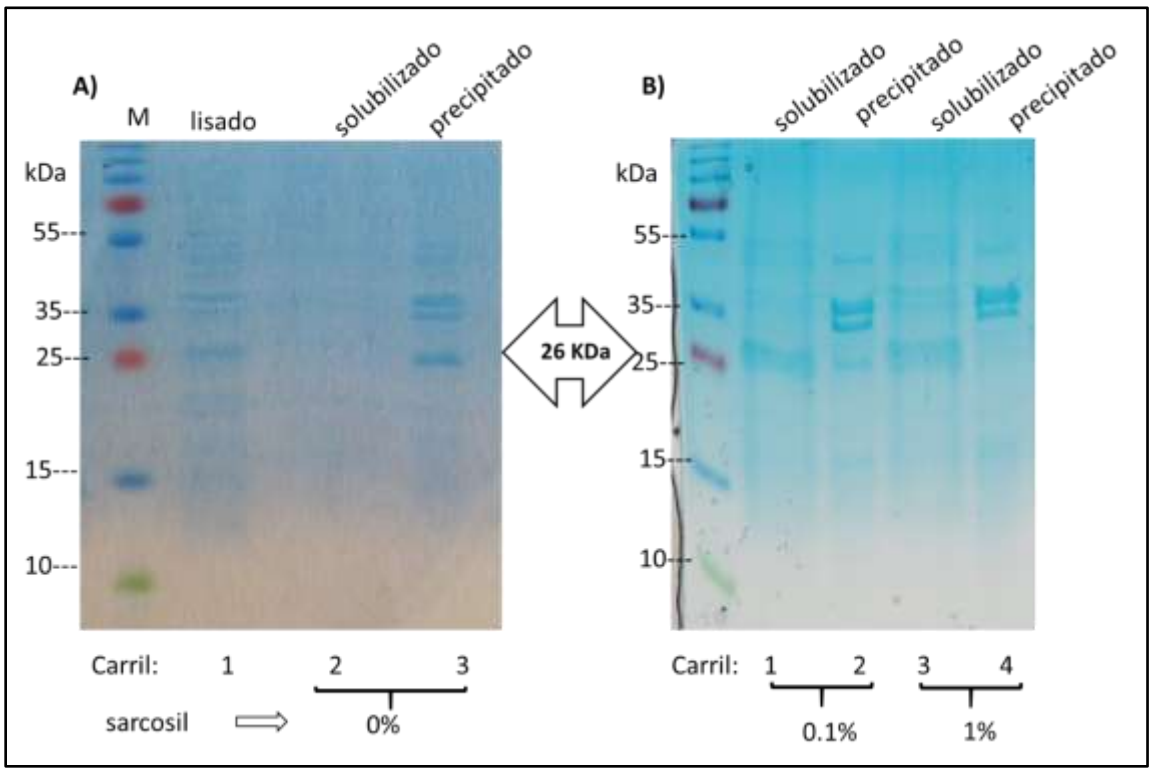


Figura 17. Solubilización de NS1 en los cuerpos de inclusión con sarcosil*. A) control para NS1, 1.- extracto total, 2.- sobrenadante con búfer de solubilización sin sarcosil, 3.-precipitado,* ***B)*** *Tratamiento de los cuerpos de inclusión con sarcosil, 1.- Sobrenadante solubilizado con 0.1 % de sarcosil, 2.- precipitado con 0.1% sarcosil 3.- sobrenadante con 1% de sarcosil, 4.- precipitado con 1% de sarcosil.*

Debido a las posibles interferencias por el sarcosil en purificaciones por columna de afinidad (IMAC) se decidió buscar un porcentaje de sarcosil menor a 1% que pudiera solubilizar la proteína NS1. La figura 18 muestra los resultados obtenidos con diferentes porcentajes de sarcosil, observando que con 0.1 y 0.2 % de sarcosil la proteína NS1 queda aún en el precipitado con los cuerpos de inclusión (carril 2 y 4) sin tener banda en la fracción soluble (carril 1 y 3). Al subir la concentración de sarcosil al 0.5% la proteína ya no se observa en el precipitado (carril 6), solubilizándose casi en un 100% (carril 5), de forma parecida con sarcosil al 1% (carril 7). Por otro lado, también se observa que hay proteínas bacterianas de peso molecular alrededor de 35 kDa que se quedan en el precipitado (carril 2,4,6 y 8) las cuales no se tienen en ninguna de las fracciones

solubles con sarcosil (carril 1,3,5 y 7), logrando eliminar estas proteínas contaminantes en este paso.

Con estos experimentos pudimos determinar que las mejores condiciones de solubilización de NS1 de los cuerpos de inclusión es con 0.5% de sarcosil.

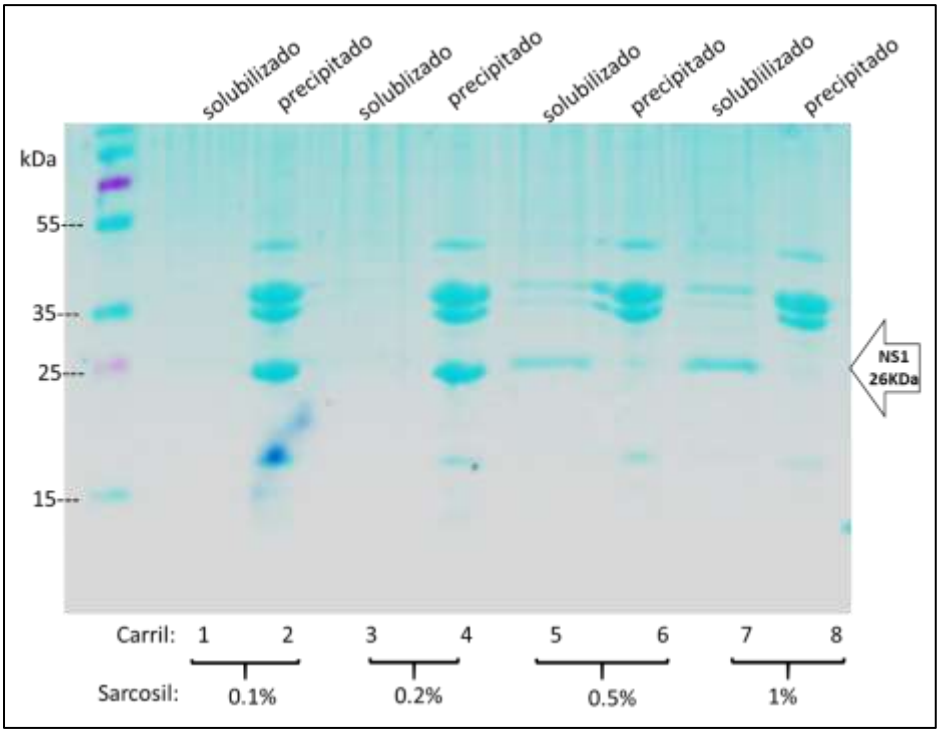


Figura 18. Solubilización de NS1 en los cuerpos de inclusión con sarcosil. *1.- Sobrenadante solubilizado con 0.1 % de sarcosil, 2.- precipitado con 0.1% sarcosil 3.- sobrenadante con 0.2% de sarcosil, 4.- precipitado con 0.2% de sarcosil, 5.- sobrenadante con 0.5% de sarcosil, 6.- precipitado con 0.5% de sarcosil, 7.- sobrenadante con 1% de sarcosil, 8.- precipitado con 1% de sarcosil.*

5.5 Purificación de la proteína recombinante NEP y NS1 por cromatografía de afinidad por inmovilización de metales (IMAC)

La cromatografía es una técnica biofísica que permite la separación, identificación y purificación de componentes de mezclas para análisis cualitativos y cuantitativos. [56] La cromatografía por inmovilización de metales (IMAC) está

basada en la afinidad de iones metálicos en transición Zn (II), Cu (II), NI (II) y Co (II) hacia la cisteína, histidina y triptófano en soluciones acuosas. El uso de estas columnas es eficiente y en una sola etapa puede obtenerse la proteína con alto grado de pureza [57].

Debido al motivo presente de histidinas (6X) en el amino terminal de las proteínas recombinantes NEP y NS1 producidas, fue posible utilizar este método de purificación [58]. Se utilizó la matriz NTA-Ni chelating-Sepharose (Amersham) compuesta por ácido trinitriloacético, que está diseñada para la purificación de proteínas nativas, recombinantes y péptidos que tienen afinidad por los iones metálico, que se activa mediante el anclaje del metal divalente níquel (Ni^{2+}).

Se monta la columna con la matriz previamente equilibrada con imidazol a concentraciones bajas y cloruro de sodio para aumentar la especificidad. Posteriormente, se agrega la muestra de interés. En IMAC el reordenamiento estérico de la proteína juega un papel muy importante [57], así que se dejó interactuar a la resina con la muestra en agitación lenta para que el motivo de 6 His de la proteína de interés interaccione con el Ni^{2+}. Posteriormente, se procedió al lavado con cloruro de sodio y concentraciones bajas de imidazol para reducir interacciones hidrofóbicas y eliminar interacciones inespecíficas de otras proteínas contaminantes que pueden causar impureza en la elución [57]. Finalmente, se eluyó la proteína de interés con un procedimiento de desplazamiento competitivo poniendo el imidazol a concentraciones altas de 100 a 600 mM [50]. La elución también se puede efectuar utilizando pH ácido o agentes quelantes, los amortiguadores de elución usualmente empleados son con pH bajo, el pKa del anillo imidazólico es protonado cuando el pH es ácido (< 5), bajo esta condición el imidazol no es capaz de unirse a los iones metálicos y eluirá. El agente quelante EDTA facilita la elución de la proteína, el EDTA extrae el ion metálico interrumpiendo la interacción entre la proteína y los ligandos metálicos [57].

5.5.1 Purificación de la proteína recombinante NEP

La purificación de la proteína recombinante NEP se realizó con la muestra obtenida de las proteínas solubilizadas con sarcosil. La figura 19 nos muestra el perfil electroforético de las diferentes etapas de la cromatofrafía. La muestra depositada en la columna (carril 1) tiene una banda mayoritaria de 15 kDa correspondiente al peso molecular de la proteína NEP.

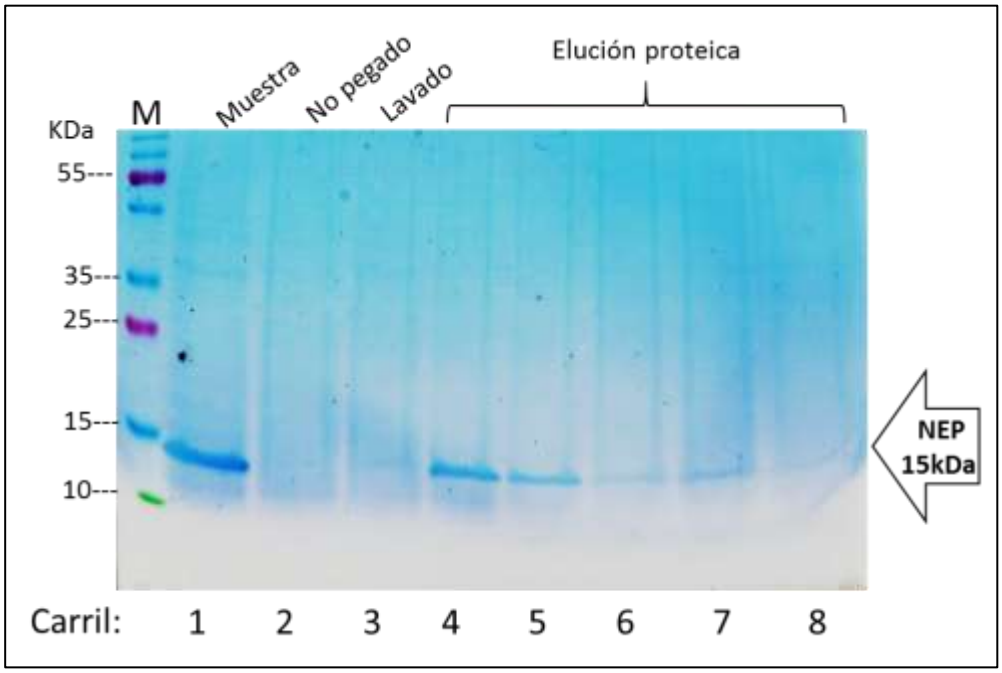


Figura 19. Purificación de NEP por cromatografía de afinidad (IMAC-NTA-Ni). *PAGE-SDS al 12%, M: proteínas marcadoras, 1.- Muestra cargada (solubilizado de NEP con 0.1% de sarcosil, Tris-HCl 50 mM, pH8, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM) (NEP, 15 kDa) 2.- Proteínas no pegadas a la columna (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM), 3.- Lavado de columna, (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 3 mM), 4,5,6,7,8.- Eluciones de la columna. (Tris-HCl 50 mM, pH 8.5, imidazol 500 mM).*

Una vez depositada la muestra se dejan eluir las proteínas contaminantes que no se pegan a la resina (carril 2), no se observa la presencia de la banda de proteína NEP (15 kDa) asegurándonos con ello que NEP interaccionó de manera eficaz con la matriz. En el lavado (carril 3), tampoco se observa la banda de 15 kDa, observando bandas poco intensas de mayor masa molecular que son proteínas que se asocian inespecíficamente a la matriz. La elución se llevó a cabo con 500 mM de imidazol (carriles 4, 5, 6, 7, 8), observando la banda de 15 kDa con alto grado de pureza, eluyendo en mayor concentración en las primeras fracciones (carril 4 y 5).

5.5.2 Purificación de la proteína recombinante NS1

Los motivos de afinidad se han convertido en herramientas estructurales y funcionales [57], aprovechando que el motivo hexahistidina presente en el amino terminal de la proteína NS1 recombinante se une a metales en transición divalenes se realizó también una purificación proteica por IMAC con la resina NTA-Ni^{2+}.

Al realizar la purificación de NS1 por IMAC con la muestra de proteínas solubilizadas de los cuerpos de inclusión con sarcosil al 0.5% tuvimos muy bajos rendimientos debido a que este detergente produce interferencia en técnicas cromatográficas de afinidad. Dado que con NEP se trabajó el sarcosil al 0.1% y la purificación fue buena, para bajar la concentración de sarcosil en la muestra de NS1 era necesario disminuir la cantidad de sarcosil a <0.1% sin que afectara la cantidad de muestra, el volumen o la solubilidad de la proteína; para realizar esto se diluyó cinco veces el solubilizado proteico en búfer Tris-HCl 50 mM pH8, hasta tener un concentrado de sarcosil de 0,1%, y posteriormente para ajustar el volumen y concentración de la proteína se realizó una precipitación con sales.

Precipitación con sulfato de amonio a saturación: por medio de una precipitación escalonada se determinó en qué fracción de saturación de sal precipita la proteína NS1. En la figura 20-A se muestra el resultado de la precipitación de NS1, observando que en la fracción 30-60% de saturación por sales tenemos la banda proteica intensa de NS1 a 26 kDa (carril 3), observando también una banda menos intensa en la muestra original diluida 1:5 (carril 1).

Paralelamente se hizo también otra modificación antes de solubilizar los cuerpos de inclusión, que consistió en resuspender los cuerpos de inclusión en 1/5 del volumen original con sarcosil 0.5% para solubilizar la proteína y después de centrifugar el sobrenadante se diluyó 5 veces para quedar a una concentración de sarcosil de 0.1%. La figura 20-B, nos muestra una buena recuperación de la proteína NS1 solubilizada, teniendo la banda de NS1 a 26 kDa con buena intensidad tanto en la solubilización de los cuerpos de inclusión en 1/5 de su volumen (carril 1) como una vez diluida la muestra solubilizada 5 veces (carril 3), quedando así el sarcosil al 0.1%.

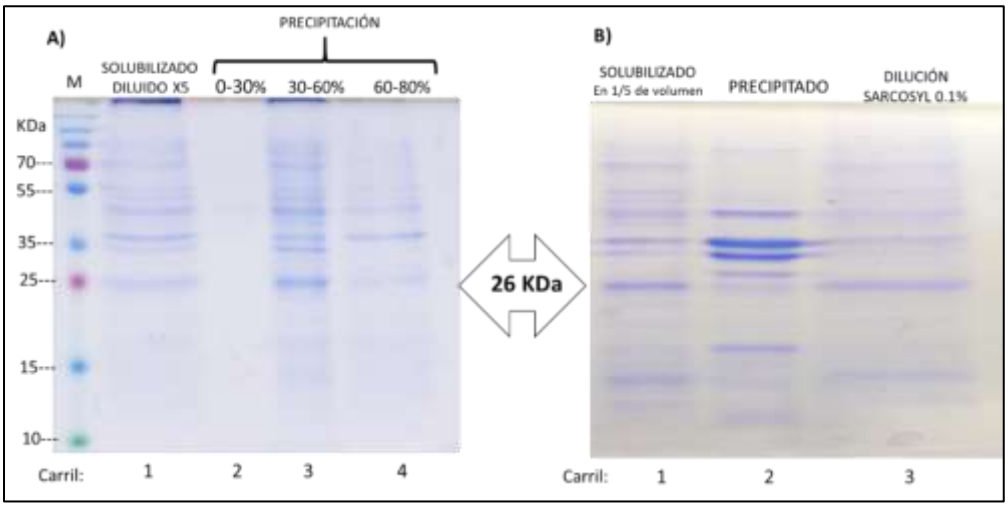


Figura 20. Precipitación por salado de la proteína NS1. *Obtención del solubilizado de NS1 a una concentración de sarcosil de 0.1%. PAGE-SDS al 12%. A) Precipitación escalonada con sulfato de amonio M.- marcador proteico, 1.- solubilizado diluido 5 veces (0.1% de sarcosil) ,2.- precipitación 0-30%,3.- precipitación 30-60%, 4.- Precipitación 60-80% B) 1.-Solubilización de los cuerpos de inclusión en 1/5 de volumen original (0.5% de sarcosil), 2.- precipitado, 3.- solubilizado diluido 5 veces (0.1% de sarcosil).*

Para continuar con la purificación, nos quedamos con este último procedimiento de diluciones, donde la proteína NS1 queda solubilizada en un volumen requerido y sarcosil al 0.1% para su uso directo en la columna de afinidad IMAC-NTA-Ni.

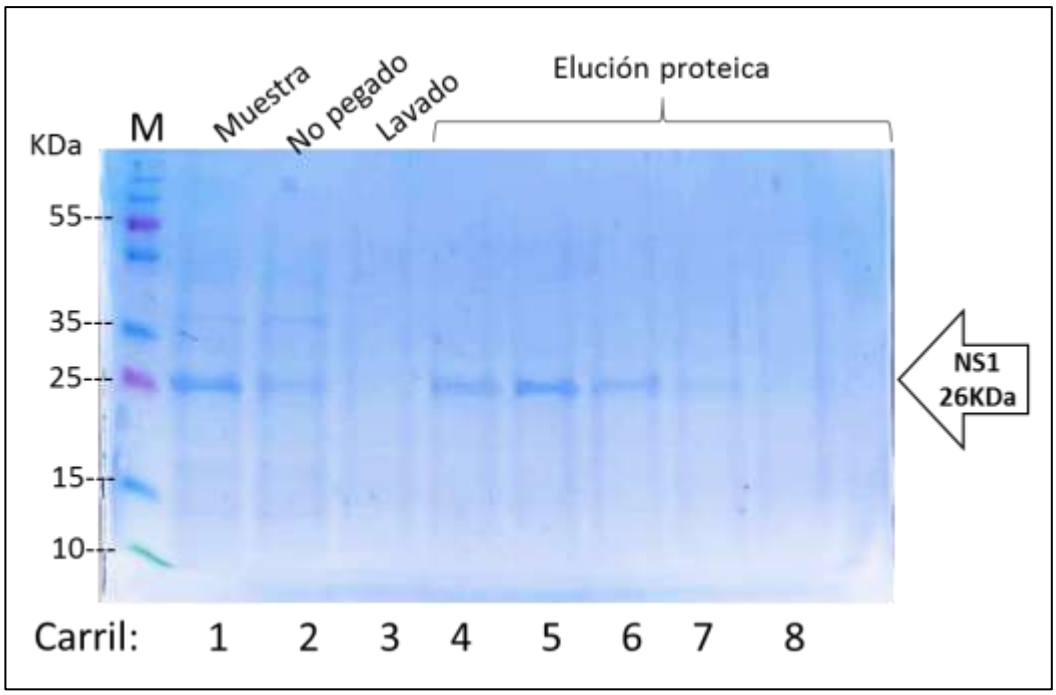


Figura 21. Purificación de NS1 por cromatografía de afinidad (IMAC-NTA-Ni). *PAGE-SDS al 12%, M: proteínas marcadoras, 1.- Muestra cargada (solubilizado de NS1 (26 kDa) con 0.1% de sarcosil, Tris-HCl 50 mM, pH8, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM) (NEP, 15 kDa) 2.- Proteínas no pegadas a la columna (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM), 3.-Lavado de columna, (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 300 mM,imidazol 30 mM), 4,5,6,7,8.- Eluciones de la columna. (Tris-HCl 50 mM, pH 8.5, imidazol 500 mM).*

Se realizó la purificación por IMAC de la proteína NS1 solubilizada, y en la figura 21 se muestra un corrimiento electroforético de las diferentes etapas de purificación. En el carril 1 está la muestra de NS1 solubilizada que se cargó a la columna, observando una banda mayoritaria a la altura de 26 kDa, correspondiente el peso molecular de la NS1. En el carril 2 están las proteínas que no se pegaron a la columna, observando una banda de mucho menor intensidad

de NS1 y en el carril 3 las proteínas que salen en el lavado donde casi ya no hay proteínas. En los carriles 4, 5 y 6 se observa la elución de la proteína de interés con concentraciones elevadas de imidazol (500 mM), teniendo una banda a 26 KDa de la proteína recombinante NS1. Podemos observar que se obtienen la proteína con un alto grado de pureza.

5.6 Purificación alternativa de NEP a partir del solubilizado proteico por cromatografía de exclusión molecular

Las proteínas pueden ser purificadas con base en sus características, tales como tamaño, forma, carga total y grupos hidrofóbicos presentes en la superficie. El principio básico de la purificación de exclusión molecular es el de utilizar materiales de dextrán para separar macromoléculas basadas en su diferencia de tamaño. Este procedimiento es básicamente usado para determinar pesos moleculares y disminuir la concentración de sales presentes en soluciones proteicas. Las moléculas grandes no pueden pasar a entre las partículas del gel y son rápidamente eluidas de la columna mientras que las pequeñas se difunden en los poros de la partícula de gel, por tanto son retenidas en la columna por un mayor tiempo [56].

Debido a la cantidad de proteína purificada a utilizar para la producción de anticuerpos monoclonales y dado el tamaño pequeño de la proteína NEP (15 kDa), y observando que después de solubilizar la proteína con sarcosil (0.1%) de los cuerpos de inclusión, se tiene en el perfil electroforético con bandas contaminantes de alto peso molecular (fig. 16-B carril 1 y 3), se decidió realizar paralelamente al IMAC, una purificación por filtración molecular la cual experimentalmente es más sencilla separando las proteínas por su tamaño. Todo esto con el fin de poder superar el rendimiento de los experimentos con IMAC.

Se utilizó un gel de Sephadex G-75, montando una columna de 50 cm de altura por 0.75 de radio, con un volumen final de gel de 79.5 ml y velocidad de elución controlada mediante una bomba peristáltica de 10 ml/h. Se calibró la columna con proteínas de peso molecular conocido con un rango entre: 66000 y 12000 kDa (figura 22-B). Por medio del seguimiento de la absorbancia a 280 nm, se obtuvo su Ve (fig 22-AB); con ello y con el Vo obtenido a través del monitoreo de la ferritina se pudo realizar la curva de calibración de la columna (fig. 22-C) graficando los valores de Ve obtenidos contra el logaritmo de la masa relativa de las proteínas marcadoras, con el que se calculó un valor de R^2=0.98. Para que una columna se considere que fue correctamente empaquetada el Vo debe ser aproximado al 30 % del volumen total de la columna [58], el porcentaje de Vo (26 ml) obtenido con respecto a volumen de la columna fue del 32% (79.5 ml), significando un buen empaquetamiento.

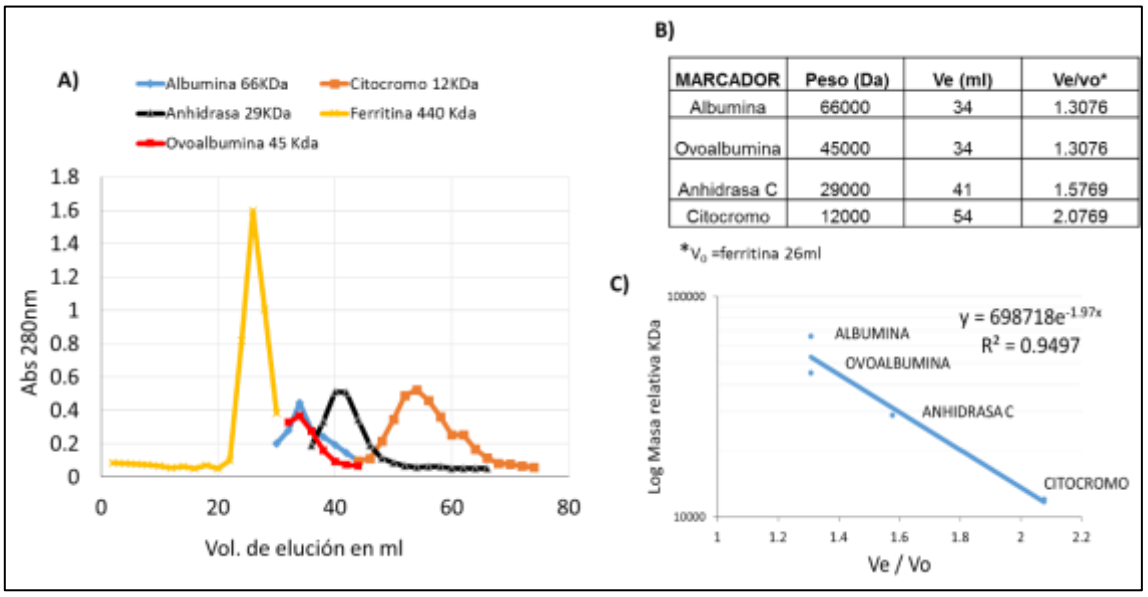


Figura 22. Curva de calibración de la columna de Sephadex G-75, A) *perfil de elución de proteínas marcadoras, leídas a 280 nm,* ***B)*** *proteínas utilizadas para la calibración de la columna,* ***C)*** *curva de calibración.*

Se cargó en la columna el solubilizado de NEP con 0.1% de sarcosil, KCl 100 mM, sorbitol 0.2 M para aumentar su viscosidad, a una concentración de proteína de 1.0708 µg/µl, se dejó correr la columna y se recolectaron alícuotas de 2 m cada una, las cuáles fueron medidas a una absorbancia de 280 nm, y graficadas en un cromatograma contra el volumen de elución.

La figura 23 nos muestra el perfil de elución de las proteínas. En la figura 23- A se midieron las proteínas a 280 nm, observando un pico pronunciado de proteínas contaminantes (antes de los 30 ml de elución) y posteriormente un aumento de la absorbancia después de los 46 ml de elución lo que indicaba presencia proteica, con base en los volúmenes de elución y el volumen relativo (Ve /Vo) con la curva de calibración se pudo determinar que se trababan de proteínas de menor tamaño que los 20 kDa, lo que nos da cierta certeza que se trata de NEP, la sensibilidad de este método (UV-visible) depende del número de aminoácidos aromáticos presentes los péptidos muestra, para verificarlo se realizó la medición de la cantidad proteica con la utilización de azul de Coomassie a las alícuotas con una mayor cantidad de proteínas teniendo también un pico de menor intensidad (figura 23-B).

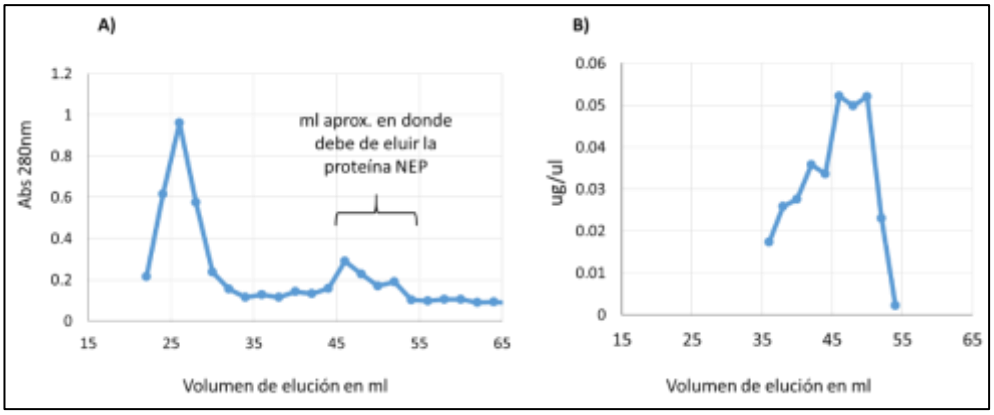


Figura 23. Cromatograma de la elución de la proteína NEP de la columna de exclusión molecular. A) *Perfil de elución de NEP leídas a una longitud de 280 nm,* ***B)*** *perfil de elución con azúl de Coomassie de la proteína NEP (36-54 ml).*

Se realizó un corrimiento electroforético de estas fracciones (concentradas 10X con acetona) observando bandas puras a una altura de 15 kDa (figura 24-A). Estas fracciones se unieron en una sola, de la cual nuevamente se corrió una electroforesis (fig. 24-B) y se realizó un Western-blot (fig. 24-C) con anticuerpos anti-His corroborando que se trataba de nuestra proteína recombinante NS1. La proteína se obtiene también con muy buena pureza aunque está muy diluida en las fracciones de la elución de la cromatografía. Se ensayaron dos métodos de concentrado, una precipitándola con sulfato de amonio, dando rendimientos muy bajos posiblemente por ser una proteína pequeña y se partía de grandes volúmenes. Se ensayó también usando el sistema de concentración Centricon (Millipore), teniendo que centrifugar por tiempos largos por el gran volumen de las fracciones, obteniendo concentración de proteína total de 22.5 µg (0.09 µg/µl, 250 µl finales), a partir de un cultivo de 25 ml de medio LB. Esta cantidad de proteína fue mucho menor de la obtenida en la purificación por IMAC.

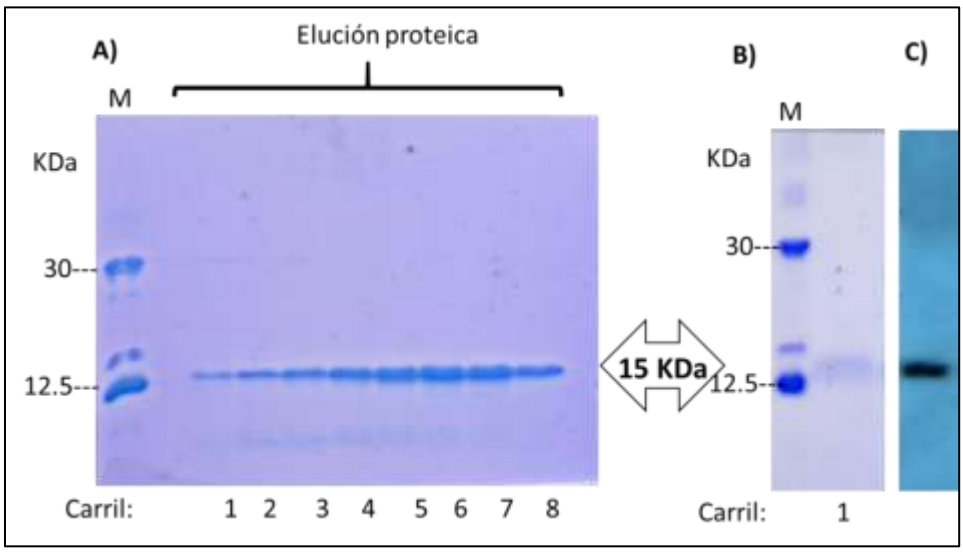


Figura 24. Columna de exclusión molecular G-75, *PAGE SDS al 15%* ***A)*** *Fracciones eluidas de la columna concentradas con acetona 1 a 10 1.-36-38 ml, 2.- 40-42 ml, 3.- 42-44 ml, 4.- 44-46 ml, 5.- 46-48 ml, 6.- 48-50 ml, 7.- 50-52 ml, 8.- 52-54 ml, M.- citocromo 12.5 kDa y anhidrasa carbónica 29 kDa.* ***B)*** *Conjunto de eluciones de NEP, M. marcador de peso molecular 1.- Conjunto de eluciones de NEP,* ***C)*** *Western-Blot con anticuerpo primario anti-His****.***

Con estos resultados decidimos seguir purificando la proteína NEP y NS1 sólo por cromatografía de Afinidad (IMAC-NTA-Ni), para tener la proteína pura necesaria para la obtención de los anticuerpos monoclonales.

5.7 Concentración de proteínas y rendimiento final proteico de IMAC-NTA-Ni

Después de las cromatografías por inmovilización de metales (IMAC-NTA-Ni), las muestras obtenidas de las eluciones de las proteínas recombinantes NEP (fig. 19) y NS1 (fig. 21), se concentraron usando unidades de filtración Centricon, que son filtros con membrana de celulosa, que retine moléculas de 3 kDa (Amicon ultra-4 3,000 MWCO), además de que es un método rápido de desalado (remueve microsolutos) a través del uso de fuerza centrífuga y presión externa, así también se puede realizar un recambio de búfer por repetidas centrifugaciones.

Mediante el uso de este sistema y, después de repetidas centrifugaciones, se determinó la concentración de proteínas, obteniendo 52.5 µg de la proteína NS1 y 42.5 µg de la proteína NEP (figura 25-A), siendo el rendimiento final proteico entre 2 y 3% de proteína pura recuperada a partir de un cultivo con 25 ml de medio LB. En otros trabajos de purificación como es el caso de la proteína recombinante peroxidasa de 40 kDa producida en *E. coli* (DE3), solubilizando sus cuerpos de inclusión con urea 8 M y purificada mediante IMAC se observó un rendimiento final proteico del 7.6 % a partir de un cultivo de 250 ml de LB [59].

A)

	Volumen µl	Proteína µg/µl	Proteína Total µg
NS1	350	0.15	52.5
NEP	250	0.17	42.5

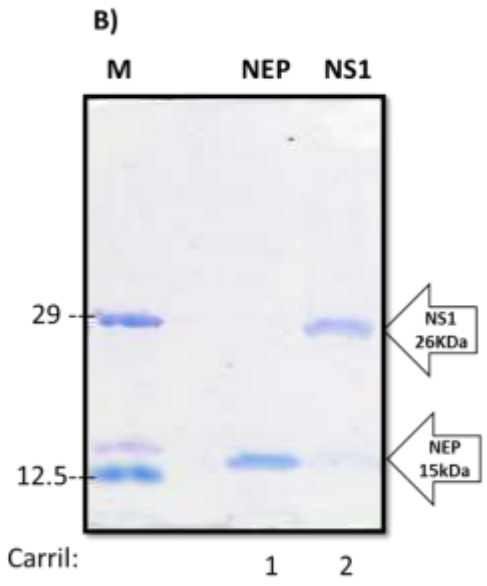


Figura 25. Proteínas NEP y NS1 purificadas y concentradas, A) *Proteínas totales obtenidas,* ***B)*** *PAGE-SDS al 12%, M.- Marcador de peso molecular, 1.- NEP 15 kDa (1.7 µg/µl), 2.- NS1 26 KDa (1.5 µg/µl).*

Al correr una PAGE-SDS (fig. 25-B) observamos una sola banda en el carril 1, correspondiente a NEP (15 kDa) y también una sola banda de NS1 (26 kDa) en el carril 2, obteniendo así preparaciones homogéneas de las proteínas recombinantes.

5.8 Producción de anticuerpos monoclonales anti-NEP y anti-NS1

(Estancia en el Laboratorio de Inmunología Viral en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la tutoría del Dr. Fernando Esquivel Guadarrama, a partir del 8 de mayo hasta el 7 de julio de 2017).

Los anticuerpos policlonales son una mezcla de inmunoglobulinas, producidos por más de una clona de linfocitos B, por lo que cada uno reconoce un antígeno distinto o diferentes epítopos de un mismo antígeno, habitualmente se obtienen a partir del antisuero sanguíneo generado a partir de la inyección reiterada de un antígeno en un animal, con el fin de generar una respuesta inmune. De este animal se toma una muestra de sangre y de esta muestra es obtenido el suero que finalmente es purificado para obtener la variedad de anticuerpos policlonales de interés.

Los anticuerpos monoclonales son producidos por una sola clona de linfocitos B por lo que todos reconocen un solo epítopo del mismo antígeno con la misma afinidad, los anticuerpos monoclonales son una poderosa herramienta para el diagnóstico de laboratorio y un instrumento cada vez más utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades [61].

Para producirlos se necesita aislar la clona de linfocitos B. Esto se puede lograr fusionando los linfocitos B de un animal inmunizado para el antígeno de interés con células de un mieloma múltiple (tumor de células plasmáticas, que provienen de los linfocitos B) para producir una célula híbrida llamada hibridoma, que puede vivir indefinidamente y puede ser aislada y caracterizada. Con ellos es posible trabajar con una entidad química homogénea y definida. Debido a esta ventaja se decidió producir anticuerpos monoclonales contra las proteínas recombinantes NEP y NS1.

5.8.1 Detección de NS1 y NEP mediante ensayo de ELISA

El ensayo de ELISA es usado como una herramienta analítica para la detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos [62]. Para determinar cuáles eran las mejores condiciones de trabajo (concentración proteica y búfer para pegado en placa) para la detección de las proteínas recombinantes NEP y NS1 se llevó a cabo una serie de ensayos de ELISA variando tanto la concentración de

proteína ocupada (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 15.6 ŋg) como el tipo de búfer para el pegado en placa de la proteína.

El primer ensayo realizado fue la detección de nuestro antígeno (proteínas recombinantes NEP y NS1) por anticuerpos policlonales anti-NEP y anti-NS1 presentes en suero de ratón (obtenidos previamente en el Laboratorio de Inmunología Viral del Dr. Fernando Esquivel). Para este ensayo se realizan diluciones sucesivas de los antígenos NEP y NS1 (con PBS en una placa de 96 pozos de alta adherencia), se ocupa como anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de ratón acoplado a fosfatasa alcalina, revelando con el sustrato de fosfatasa. La placa fue leída a 405 nm. Los resultados promediados y graficados se muestran en la figura 26. Se detectó, a la proteína NEP ya que la absorbancia aumentó conforme aumenta la concentración de anticuerpo, en cambio la proteína NS1 no fue posible detectarla (valores poco significativos).

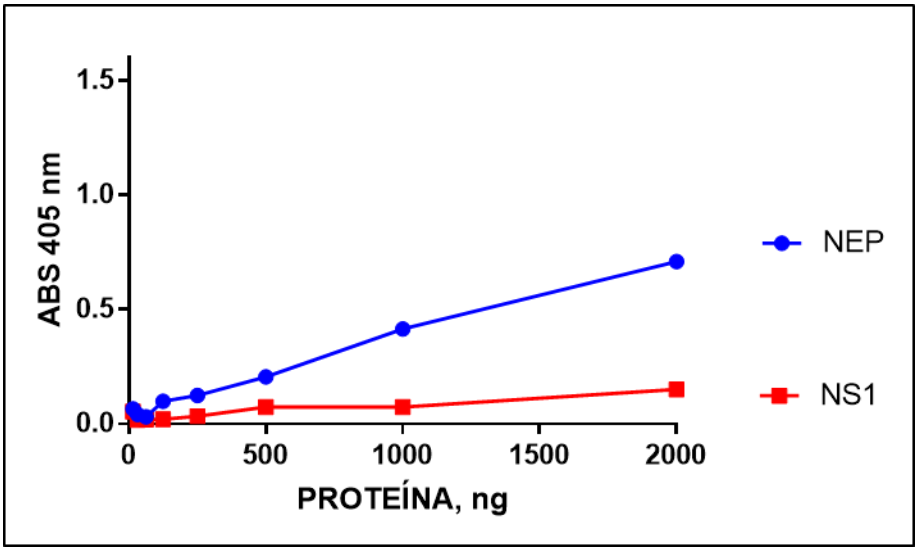


Figura 26. Detección de antígeno (NEP y NS1) por el método de ELISA *con fosfatasa alcalina, búfer de fosfatos.*

Se repitió el ensayo, esta vez con búfer de carbonatos para aumentar la adhesión del antígeno a la placa, así como utilizó anticuerpos anti-NS1 comerciales para asegurar la identificación del antígeno NS1. En la figura 27 observamos que con el búfer de carbonatos es posible detectar una concentración menor a la proteína NEP que con PBS (fig. 26), en cambio con la proteína NS1 no se detecta presencia de anticuerpos, aún utilizando anticuerpos monoclonales comerciales, esto nos puede sugerir que la NS1 no se pega a placa de manera conveniente, o no es reconocida por los anticuerpos probados.

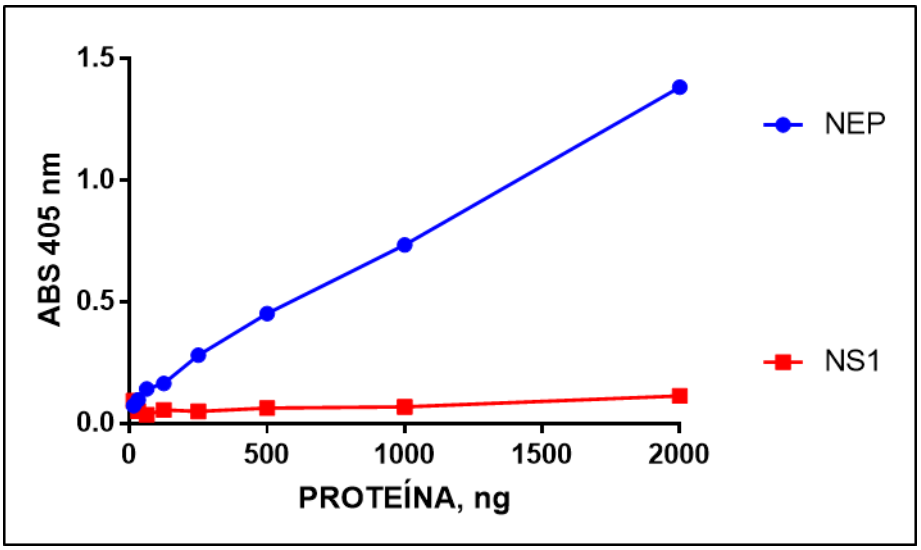


Figura 27. Detección de antígeno (NEP y NS1) por el método de ELISA *con fosfatasa alcalina, búfer de carbonatos y anticuerpos monoclonales comercial (anti-NS1).*

5.8.2 Obtención de anticuerpos anti-NEP y anti-NS1 en ratones

Se trabajó con ratones de la cepa BALB/c (2 ratones por cada antígeno) provenientes del Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM de Cuernavaca Morelos. Los antígenos (proteínas recombinantes NEP y NS1 purificadas) en forma de emulsión con adyuvante de Freund completo o incompleto (FCA y FIA) se inocularon a los ratones vía intraperitoneal, se

realizaron 3 inmunizaciones cada 12 días. El FCA contiene *Mycobacterium tuberculosis* inactivadas por calor seco, las micobacterias en el adyuvante atraen a los macrófagos y otras células al sitio de inyección, lo que mejora la respuesta inmune. Por esta razón, el adyuvante completo de Freund se usa en la inyección inicial y el adyuvante incompleto de Freund en las posteriores para prevenir posibles procesos de hipersensibilidad. Los antígenos en emulsiones de agua en aceite (AFC y AFI) estimulan la respuesta inmune prolongadamente, esto pueden atribuirse a la liberación lenta de antígeno [61].

Previa a cada inoculación se realizó una toma de suero sanguíneo y se realizó un monitoreo de la producción de anticuerpos por el método de ELISA.

La producción de anticuerpos se siguió a lo largo de 36 días que duró la inmunización y fue comparado con los anticuerpos naturales presentes en el animal previo a las inoculaciónes (control negativo).

La respuesta antigénica a NEP fue evaluada por un ensayo de ELISA esto haciendo reaccionar a la proteína recombinante NEP y los sueros de ratones obtenidos en las etapas de inmunización (preinoculación, 1er, 2° y 3er sangrado).

Como se puede observar en la figura 28, los anticuerpos reconocen la proteína NEP durante los días de inmunización y aumenta con el tiempo. Las diferencias de densidad óptica van en aumento progresivo lento en los primeros 24 días, el ratón número 1 tuvo una mejor respuesta antigénica a partir de la 3ª inmunización donde se observa un rápido aumento de la cantidad de anticuerpos

Se realizó el seguimiento de los anticuerpos en suero de ratones inoculados con la proteína recombinante NS1. La figura 29 nos muestra que a lo largo de todo el proceso de inmunización no se detectaron anticuerpos presentes en el suero, sugiriendo que la proteína NS1 no se pegaba de manera oportuna a la placa. Para observar si NS1 recombinante es una molécula lo suficientemente antigénica como para generar una respuesta inmunológica observable sería necesario probar con otras técnicas de reconocimiento antígeno-anticuerpo como slot-blot

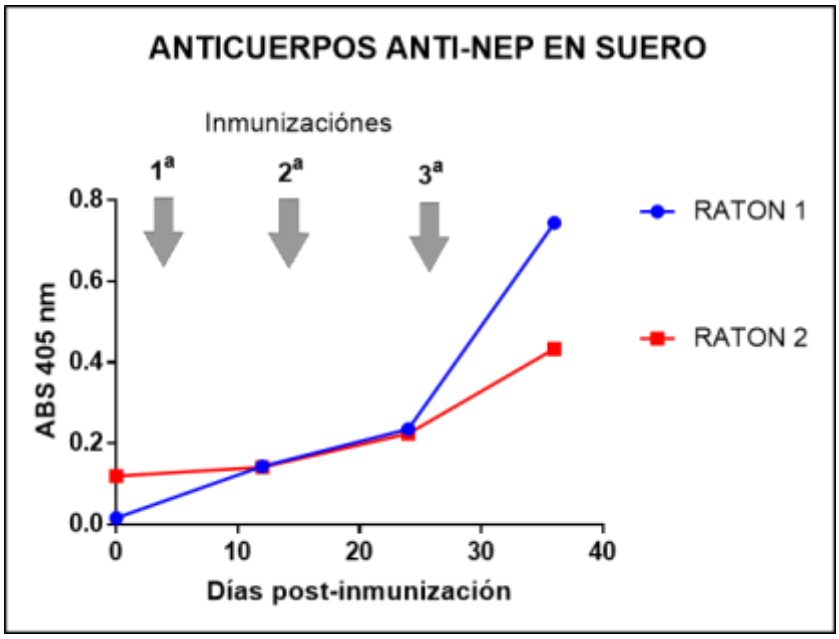


***Figura 28. Anticuerpos anti-NEP presentes en suero de ratones**. Los sueros de ratones se valoraron por ELISA indirecto durante el proceso de inmunización en dos ratones de la cepa BALB/c.*

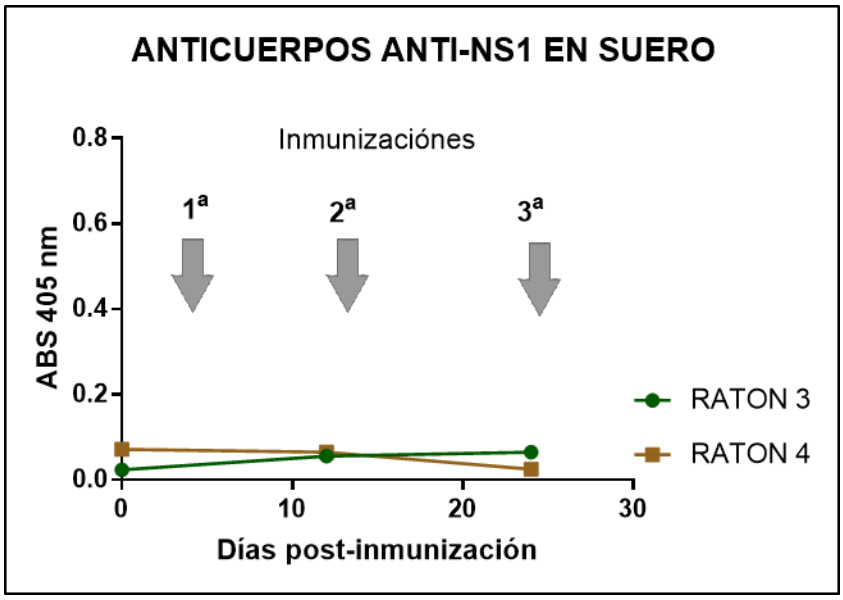


***Figura 29. Anticuerpos anti-NS1 presentes en suero de ratones**. Los sueros de ratones se valoraron por ELISA indirecto durante el proceso de inmunización en dos ratones de la cepa BALB/c.*

En mayo del 2017 el Instituto de Medicina Veterinaria de Shangahi reporta la generación de anticuerpos monoclonales contra NS1 de virus de la influenza A de murciélago, los anticuerpos producidos fueron capaz de reconocer no solo virus de la influenza aislados de murciélagos, también la cepa Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/California/04/09 (H1N1) y varias otras cepas de infectantes de anátidas y suídos, este reconocimiento antígeno-anticuerpo se realizó por métodos de ELISA, Western-blot e inmunofluorescencia [62]. Es posible que realizando algunos cambios en los protocolos pueda lograrse el objetivo de generar anticuerpos efectivos contra la proteína NS1, sin embargo, por el momento en el presente trabajo decidimos enfocarnos en la obtención de anticuerpos monoclonales contra la proteína recombinante NEP.

5.8.3 Obtención de hibridomas (fusión de células de bazo y de mieloma)

Después de determinar que el ratón 1 tenía un mayor título de anticuerpos anti-NEP (fig.28), se realizó una última inoculación intraperitoneal con el antígeno (NEP,15 μg), se extrajo el bazo 3 o 4 días después y las células se fusionaron con células de mieloma (SP2/0) carentes en hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT). Estas enzimas permiten la utilización de bases púricas o pirimidínicas de origen exógeno para la síntesis de ADN celular, por lo que al carecer de ellas sólo podrá obtener bases nitrogenadas endógenas para la replicación del material genético [63]. La fusión celular (figura 30) se realizó con polietilenglicol y DMSO y se cultivaron con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) como suplementos; la aminopterina es un antagonista competitivo del ácido dihidrofólico, vitamina necesaria en la síntesis de los nucleótidos necesarios para estructurar del ADN. De esta manera queda bloqueado el empleo de bases nitrogenadas endógenas para la síntesis de ADN, pero los linfocitos B de origen esplénico presentarán la información genética para la síntesis de HGPRT y lo aportarán a la célula híbrida permitiendo su sobrevivencia al emplear las bases

nitrogenadas del medio selectivo externo para su síntesis de ADN [63]. Las células fusionadas se cultivaron en placas de 96 pozos con medio RPMI suplementado con HAT y suero fetal bovino al 20 %.

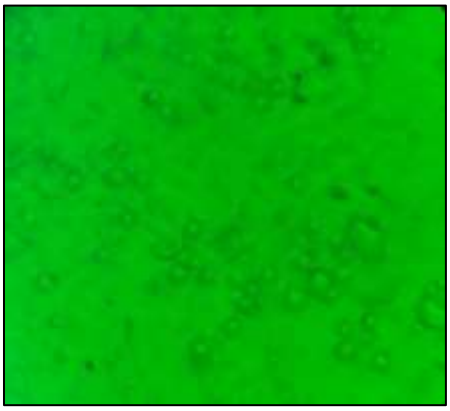


Figura 30. Hibridomas, *producidos a partir de células SP2/0 y células de bazo de ratón inmunizado con la proteína recombinate NEP. Microscopio óptico 20X.*

5.8.4 Detección de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-NEP

La producción de anticuerpos específicos se analiza en los sobrenadantes de los pocillos de las placas de cultivo, seleccionando sólo los que presentaron una densidad óptica mayor en un ensayo de ELISA [60]. Como control positivo, se utilizó el suero extraído del ratón N°1 (fig. 28) sacrificado (anticuerpos policlonales anti-NEP), y como control negativo suero del ratón N°1 antes de ser inoculado. Los resultados considerados positivos se muestran en la figura 31, se obtuvieron 10 pozos positivos en la 1ª placa, 4 en la 2ª y 4 en la 3ª, con diferentes niveles de producción de anti-NEP.

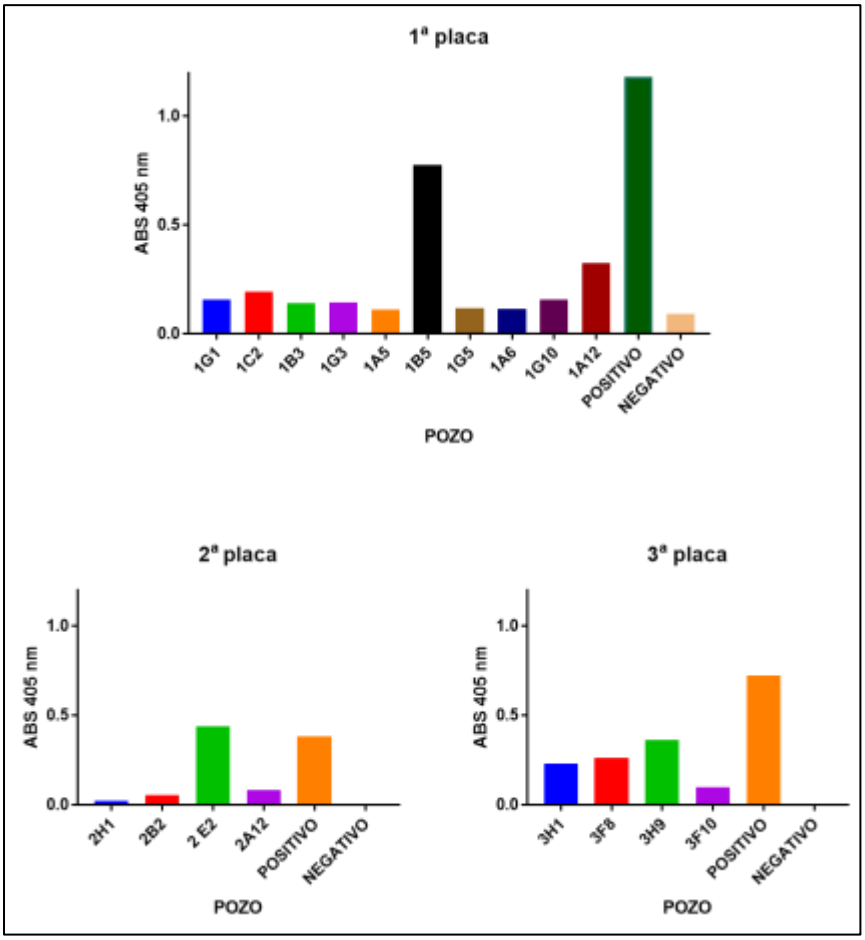


Figura 31. Ensayo de ELISA para la detección de hibridomas productores de anticuerpo anti-NEP *sembradas en cajas de 96 pozos* ***A)*** *1ª placa,* ***B)*** *2ª placa 2,* ***C)*** *3ª placa.*

Los 18 pozos positivos: 1G1, 1C2, 1B3, 1G3, 1A5, 1B5, 1G5, 1A6, 1G10, 1A12, 2H1, 2B2, 2E2, 2A12, 3H1, 3F8, 3H9 y 3F10 seleccionados fueron resembrados en placas de 48 pozos con medio suplementado con HAT(segundo pase), 3 días posteriores a esto, se observó crecimiento sólo en 13 pozos (1C2, 1G3, 1A5, 1B5, 1G5, 1A6, 1A12, 2B2, 2E2, 2A12, 3H1, 3F8, 3F10). Se realizó nuevamente un sondeo de estos hibridomas para observar cuál de ellos conservaba la capacidad de producción de anticuerpos anti-NEP siguiendo la metodología anterior, (se analizaron conjuntamente otros pozos denominados

1,2,3,4,5,6,7,8,9 que anteriormente no habían sido analizados). En este análisis los pozos fueron promediados y graficados, y se muestran en la figura 32, observando que muchos de estos pozos conservaron su capacidad para producir anticuerpos anti-NEP; en cambio, otros la perdieron ya que como producto de la fusión de la célula de mieloma y la del linfocito se produce un hibridoma de elevado número de cromosomas, que en divisiones sucesivas celulares se irán perdiendo. Como consecuencia de esta pérdida de cromosomas algunas células pierden la capacidad de secreción de anticuerpos o de funciones básicas para viabilidad celular [63]

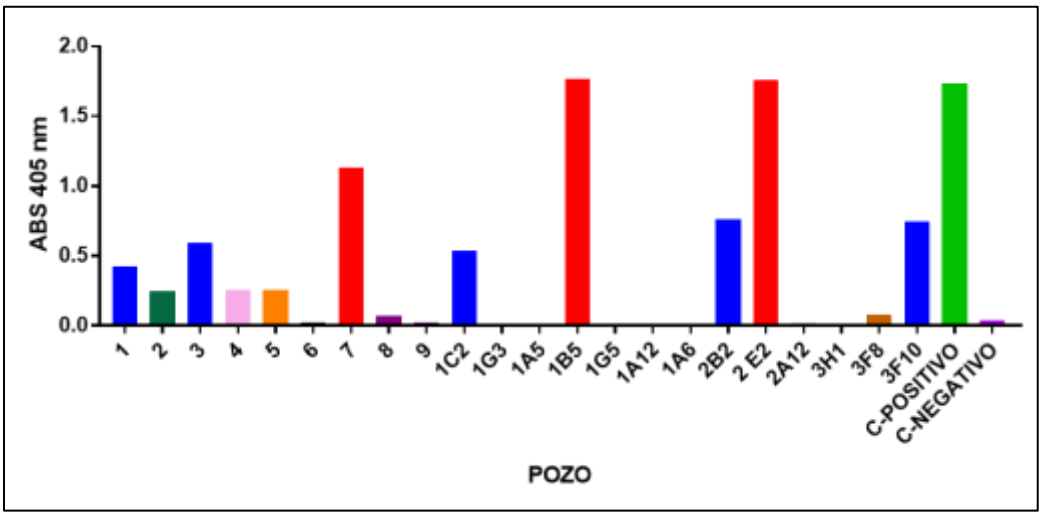


Figura 32. Ensayo de ELISA para la detección de hibridomas productores de anticuerpo anti-NEP (segundo pase) *sembradas en cajas de 48 pozos, barras color rojo = 1ª prioridad, barras color azul = 2ª prioridad.*

Con base en los resultados del segundo pase, se determinó seguir trabajando con los pozos de mayor respuesta, los pozos con una absorbancia mayor a 1 nm (fig. 32, barras color rojo) se tomaron como los mejores productores de anticuerpos, categorizándolos como de primera prioridad (7, 1B5, 2E2), los que se encontraron entre los rango 0.4 a <1 nm se categorizaron como de segunda

prioridad (fig. 30 barras color azúl, 1, 3, 1C2, 2B2, 3F10) Estos hibridomas fueron traspasados nuevamente a una placa de 24 pozos con medio HT (tercer pase).

5.8.5 Determinación de especificidad de reconocimiento de los hibridomas

Es posible que los hibridomas produzcan anticuerpos con afinidad por NEP y por otros antígenos, así que por medio de un ensayo de ELISA se determinó si los hibridomas 1, 3, 7, 1B5, 1C2, 2B2, 2E2, 3F10 producían anticuerpos específicos y/o inespecíficos que además de NEP reconocieran otros antígenos. En este ensayo se utilizaron los antígenos: la proteína recombinante NEP, M2 (péptido de 25 a.a del virus de la influenza) y His-VP6 (proteína recombinante de rotavirus que cuenta un motivo de 6 Histidinas en su amino terminal) [64], los cuales se colocaron en una placa para ELISA y se pusieron a reaccionar con sobrenadantes de los hibridomas 1, 3, 7, 1B5, 1C2, 2B2, 2E2, 3F10. Los resultados promediados y graficados se muestran en la figura 33. Se utilizaron sueros de ratones inoculados con los respetivos antígenos (anticuerpos policlonales) como control positivo. El hibridoma 1B5 resultó ser reactivo a los antígenos utilizados, este anticuerpo polireactivo puede que se trate de un anticuerpo natural o de fondo, que ocurren a una abundancia baja independientemente de la estimulación [62]. Los anticuerpos naturales son típicamente de la clase IgM y no han pasado por hipermutación y maduración por afinidad a antígenos particulares. Gracias a este ensayo se descartó el hibridoma 1B5, el cual lo teníamos categorizado como prioridad 1. Los hibridomas 7, 1C2, 2B2, 2E2, y 3F10 presentan una especificidad adecuada por NEP para seguir trabajando con ellos.

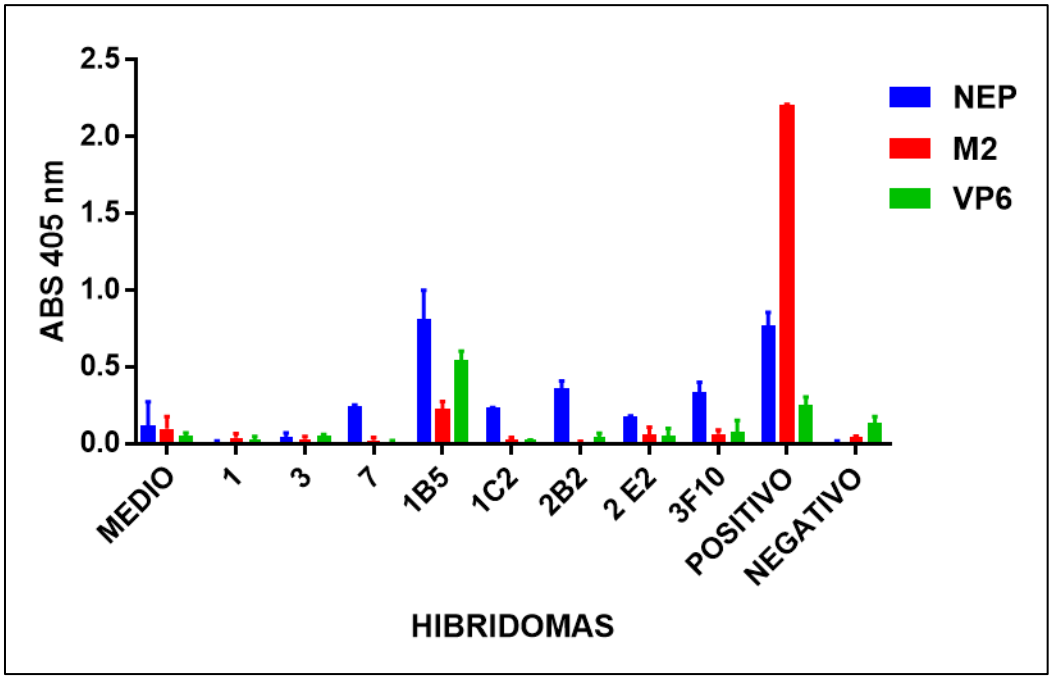


Figura 33. Especificidad de los hibridomas productores de anticuerpo anti-NEP (ensayo ELISA). *Antígenos utilizados: NEP (proteína recombinante), M2 (péptido de 25 a.a. del virus de la influenza) y VP6 (rotavirus).*

5.8.6 Obtención de clonas a partir de hibridomas

Hasta el momento los hibridomas seleccionados están compuestos por una población heterogénea celular, es decir, formados por diversas células que podrían o no producir anticuerpos, producir anticuerpos que reconocieran a NEP u otro antígeno, y además células que produjeran anticuerpos contra una región específica de NEP o contra otra. Así que el siguiente paso fue la obtención de clonas aisladas a partir de 3 hibridomas seleccionados: 7, 2E2 y 3F10 (fig. 35).

Para esto se utilizó un método de dilución límitante en donde las células de los hibridomas 7, 2E2 y 3F10 fueron contadas con azul de tripano para posteriormente, hacer diluciones sucesivas de estas suspensiones celulares y poder cultivarlas en placas de 96 pozos con una densidad poblacional de 0.9

cel/pozo. Al tercer día se observó el crecimiento de una sólo colonia por pozo, asumiendo así que se trataban de colonias monoclonales. Se observó un crecimiento en 39% de los pozos de la placa 7, 28% en la placa 2E2 y 17% en la placa 3F10 (los pozos en donde se observó crecimiento fueron enumerados del 1 al 82).

5.8.7 Determinación de clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-NEP mediante ELISA

Después de 14 días de los cultivos de las clonas 7, 2E2 y 3F10, se llevó a cabo en cada pozo el escaneo de clonas para determinar cuál de ellas producían anticuerpos monoclonales anti-NEP, para esto se realizó un ensayo de ELISA, con el antígeno NEP y el sobrenadante extraídos de los cultivos. Sólo se observaron 4 pozos positivos de 38 crecidos en los pocillos con el hibridoma 7 (clona 3, 20,30 y 38) y 4 positivos con el hibridoma 3F10 (clonas 69, 70, 77 y 82) los cuáles representa entre 10 y 20% respectivamente de rendimiento, no tuvimos ningún positivo con el hibridoma 2E2.

Las clonas positivas (3F10.70, 3F10.77, 3F10.82, 7.20 y 7.30) que presentaron una mayor absorbancia fueron resuspendidas y sembradas en placas de 48 pozos con medio RPMI+, fueron analizadas por ELISA para eliminar falsos positivos, y verificar que producen anticuerpos monoclonales anti-NEP. Los resultados por triplicado se muestran en la figura 34. Se utilizó como control negativo el medio RPMI+, para verificar que no existieran falsos positivos por interacción de medio, el control positivo fueron los anticuerpos policlonales anti-NEP presentes en el suero del ratón N°1 (fig. 28), y el negativo el suero del ratón N°1 antes pre-inoculación. Con este ensayo pudimos establecer que se obtienen 4 clonas (3F10.70, 3F10.77, 3F10.82, y 7.30) que producen anticuerpos monoclonales anti-NEP, además ahora nos es posible disponer de cantidades ilimitadas de anticuerpo monoclonal anti-NEP con especificidades precisas.

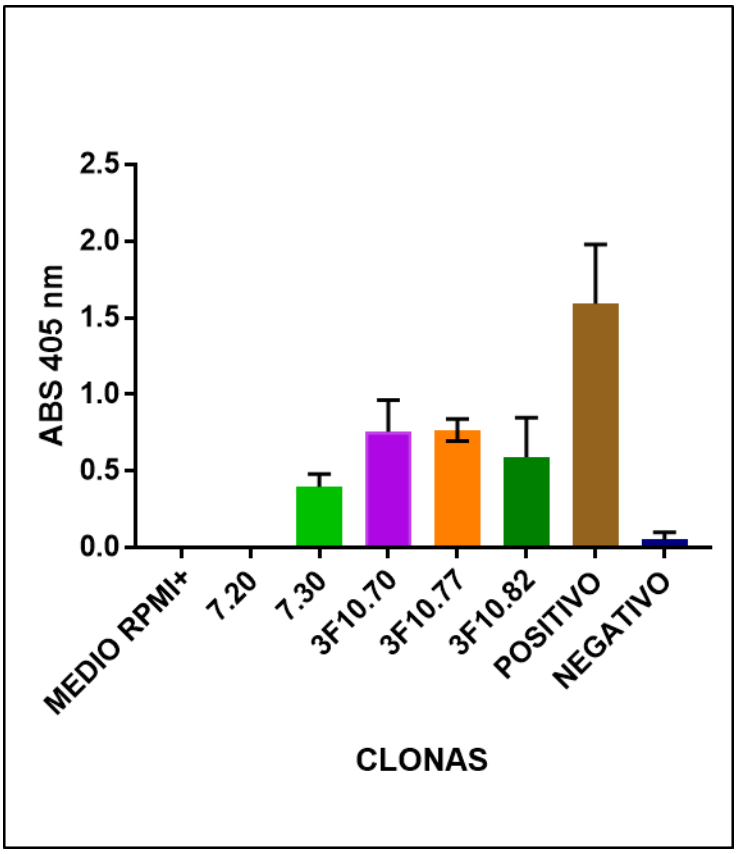


Figura 34. Clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-NEP *(ensayo de ELISA).*

5.8.7 Mantenimiento de hibridomas en placa y viales

Los hibridomas son impredecibles por lo tanto es importante disponer de alícuotas congeladas de las células con el fin tener un respaldo cuando surja una acumulación de cambios genéticos. Tan pronto se identifica como positivo un pozo se debe someter al proceso de clonación y preservación celular por medio del congelamiento, esto para evitar perder el hibridoma o clona productora de anticuerpos monoclonales que debido a sucesivas divisiones celulares y a la continuas pérdidas cromosomales comúnmente tienden a perder esta capacidad, remplazándose por células no productoras, que al ser metabólicamente más

eficientes acabaran por dominar el cultivo. Se congelaron los hibridomas 1G1, 1C2, 1B3, 1G3, 1A5, 1B5, 1G5, 1A6, 1G10, 1A12, 2H1, 2B2, 2E2, 2A12, 3H1, 3F8, 3H9 y 3F10 de las placas madre (96 pozos) (fig. 31) y los hibridomas 1, 3, 7, 1B5, 1C2, 2B2, 2E2, 3F10 en las placas de 24 pozos (fig.32). Además, se realizaron cultivos en cajas de 25 y 75 cm^2 para obtener las suficientes células para poder congelar viales de 1ml de volumen (20, 30, 70, 77, 82). Gracias al congelamiento celular, además de tener un respaldo de trabajo, podemos seguir analizando los hibridomas 1C2, 2E2 y 2B2 de los cuales se tienen grades posibilidades de obtener más clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-NEP.

5.8.8 Comprobación de clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-NEP mediante Western-blot

Para corroborar que los anticuerpos monoclonales producidos 3F10.70, 3F10.77, 3F10.82, y 7.30 fueran capaces de reconocer la proteína recombinante NEP se realiza un ensayo de Western-blot. En la figura 35 (carril 1, 2, 3, 4) se puede observar bandas de 15 kDa, peso de la proteína NEP lo que nos sugiere que este anticuerpo monoclonal reconoce epítopos lineales. En el carril 5 (clona 7.20) fue congruente con el ensayo de ELISA (figura 34) ya que no se detecta el reconocimiento de la proteína NEP. Gracias al Western-blot se identifica además de la banda perteneciente a NEP (15 kDa) otras bandas de mayor tamaño (30 y 45 kDa); esto podría deberse a que la proteína NEP se encuentra aglomerada ya que se observa que anticuerpos monoclonales específicos para la proteína NEP están detectando monómeros principalmente, teniendo bandas menos intensas de dímeros y trimeros de esta misma proteína, anteriormente se ha descrito que a la región resistente a proteasas de NEP (carboxilo terminal) como un homodímero por la asociación de su hélice C1 a C2 de otro monómero NEP y viceversa, esta asociación además de encontrarse en la estructura cristalizada, permanece presente en corrimientos electroforético aún en condiciones desnaturalizantes [34].

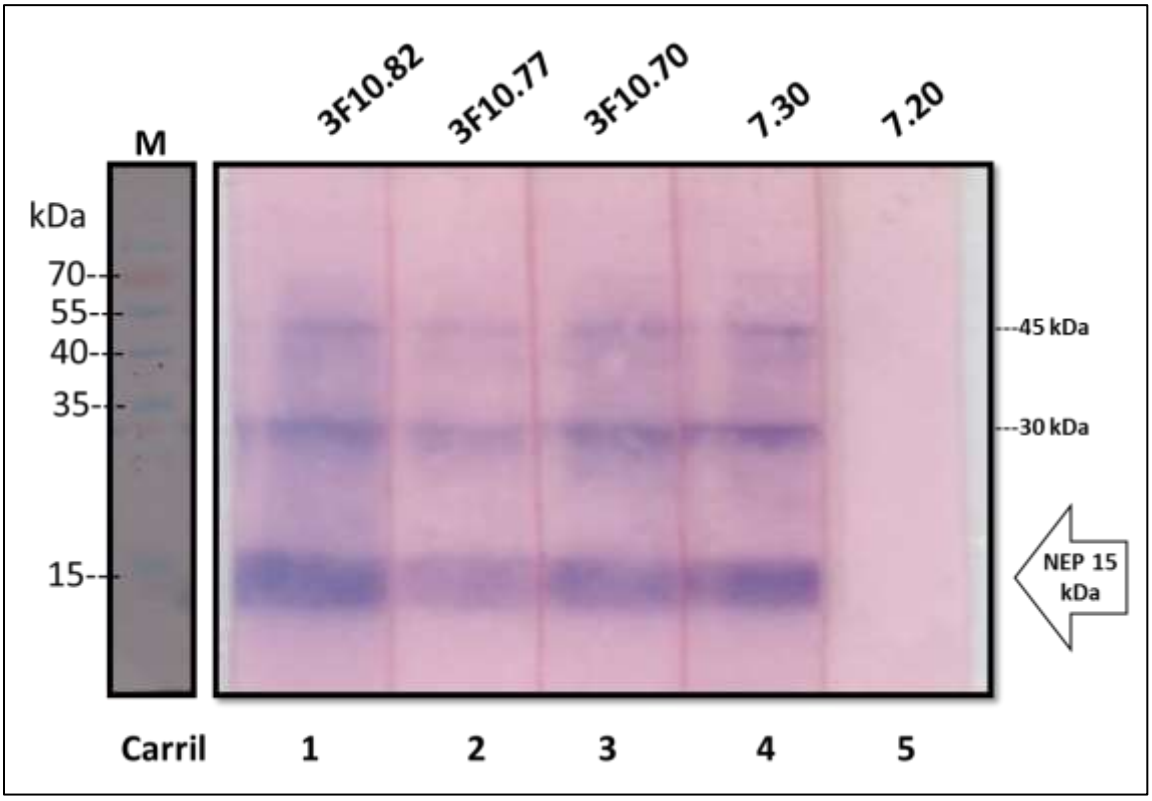


Figura 35. Detección de antígenos NEP por los anticuerpos monoclonales anti-NEP producidos. *Western-blot, Monómero NEP (15 kDa), dímero NEP (30 kDa) M. marcador proteico, Anticuerpo monoclonal 1.- 3F10.82, 2.- 3F10.77 3.- 3F10.70 4.- 7.30. (Anticuerpo secundario: anti-IgG/A/M de ratón acoplado a fosfatasa alcalina).*

6. CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo la expresión de las proteínas NS1 y NEP del virus de la influenza A H1N1 pmd09 en *E. coli* cepa BL21 (DE3).
- Las mejores condiciones para la expresión fueron a una concentración de IPTG de 0.1 mM, durante 6 h. de incubación a 37 °C.
- Ambas proteínas se acumulan en cuerpos de inclusión dentro de *E. coli*, logrando solubilizarlas con sarcosil, obteniendo mejores resultados con concentraciones de 0.1% para NEP y de 0.5% para NS1.
- Se realizó la purificación de la proteína NEP por medio de una cromatografía de exclusión molecular y por medio de una de afinidad (IMAC), teniendo mejores resultados con la de afinidad eluyendo la proteína con búfer Tris-HCl 50 mM, pH 8.5, imidazol 500 mM. Se obtuvieron ≈42.5 µg de proteína pura.
- Se realizó una cromatografía de afinidad para la purificación de la proteína NS1 utilizando para eluir el amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH8.5, imidazol 500 mM. Se obtuvieron ≈52.5. µg de proteína pura.
- Se obtuvieron 4 clonas productoras de anticuerpos monoclonales anti-NEP 3f10-70,3f10-77, 3f10-82 y 7-30.
- Se corroboró la especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-NEP obtenidos mediante ensayos de ELISA y Western-blot.

7. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- Determinar el isotipo de los anticuerpos producidos: IgG, IgA, IgM.
- Realizar una titulación de los anticuerpos monoclonales producidos con el antígeno NEP por el método de ELISA y Western-Blot, necesario para optimizar la dilución de estos biorreactivos para cada ensayo futuro a realizar.
- Corroborar la especificidad de los anticuerpos obtenidos mediante ensayos de ELISA, WB e inmunofluorescencia usando como antígeno cultivos infectados con diversas cepas del virus de la influenza A.
- Realizar ensayos de antigenicidad con las proteínas puras (NS1 y NEP) y sueros de pacientes infectados.
- Patentar los anticuerpos y antígenos producidos.
- Realizar mapeos de NEP para determinar qué región de la proteína es reconocida por los anticuerpos monoclonales producidos.
- Continuar con el estudio de las propiedades e interacciones tanto de NS1 y NEP a nivel celular e identificar los componentes proteicos que favorezcan la patogénesis viral.

8. REFERENCIAS

[1] Wang, X., Li, M., Zheng, H., Muster, T., Palese, P., Beg, A. A., & García-Sastre, A. (2000). Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-κB and induction of alpha/beta interferon. *Journal of virology, 74*(24), 11566-11573.

[2] Nogales, A., Rodriguez, L., DeDiego, M. L., Topham, D. J., & Martínez-Sobrido, L. (2017). Interplay of PA-X and NS1 proteins in replication and pathogenesis of a temperature-sensitive 2009 pandemic H1N1 influenza A virus. *Journal of Virology, 91*(17), e00720-17.

[3] Anastasina, M., Le May, N., Bugai, A., Fu, Y., Söderholm, S., Gaelings, L., Ohman, T., Tynell, J., Kyttänen, S., Barboric, M., Nyman, T. A., Matikainen, S., Julkunen, I., Butcher, S. J., Egly, J., & Kainov., D. E. (2016). Influenza virus NS1 protein binds cellular DNA to block transcription of antiviral genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 1859*, 1440-1448.

[4] Clark, A. M., Nogales, A., Martinez-Sobrido, L., Topham, D. J., & DeDiego, M. L. (2017). Functional Evolution of Influenza Virus NS1 Protein in Currently Circulating Human 2009 Pandemic H1N1 Viruses. *Journal of Virology, 91*(17), e00721-17.

[5] Paterson, D., & Fodor, E. (2012). Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP). *PLoS pathogens, 8*(12), e1003019.

[6] Jureka, A. S., Kleinpeter, A. B., Cornilescu, G., Cornilescu, C. C., & Petit, C. M. (2015). Structural basis for a novel interaction between the NS1 protein derived from the 1918 influenza virus and RIG-I. *Structure, 23*, 2001-2010.

[7] Scalera, N. M., & Mossad, S. B. (2009). The first pandemic of the 21st century: review of the 2009 pandemic variant influenza A (H1N1) virus. *Postgraduate medicine, 121*(5), 43-47.

[8] Neumann, G., & Kawaoka, Y. (2011). The first influenza pandemic of the new millennium. *Influenza and other respiratory viruses, 5*(3), 157-166

[9] Robb, N. C., Smith, M., Vreede, F. T., & Fodor, E. (2009). NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *Journal of general virology, 90*, 1398-1407.

[10] Smelkinson, M. G., Guichard, A., Teijaro, J. R., Malur, M., Loureiro, M. E., Jain, P., Ganesan, S., Zuñiga, E. I., Krug, R. M., Oldstone M.B., & Bier, E. (2017). Influenza NS1 directly modulates Hedgehog signaling during infection. *PLoS pathogens, 13*(8), e1006588.

[11] Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G., & Perez, D. R. (2001). Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of virology, 146*, 2275-2289.

[12] Stevaert, A., & Naesens, L. (2016). The influenza virus polymerase complex: an update on its structure, functions, and significance for antiviral drug design. *Medicinal research reviews. 36*(6), 1127-1173

[13] Wu, N. C., & Wilson, I. A. (2017). A perspective on the structural and functional constraints for immune evasion: Insights from influenza virus. *Journal of Molecular Biology, 429*(17), 2694-2709.

[14] Kakisaka, M., Mano, T., & Aida, Y. (2016). A high-throughput screening system targeting the nuclear export pathway via the third nuclear export signal of influenza A virus nucleoprotein. *Virus research, 217*, 23-31.

[15] Byrd-Leotis, L., Cummings, R. D., & Steinhauer, D. A. (2017). The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase. *International journal of molecular sciences, 18*(7), 1541.

[16] Shaw, M. L., Palese, P., (2013). Principles of Virology. Orthomyxoviridae. En D., M., Knipe, P. M., Howley, fields virology, (p.p.1151-1185), Philadelphia USA: lippincott williams & wilkins, a wolters kluwer

[17] Sampablo, A. (2014). Identificación del papel de las proteínas NS1 y NEP del virus de influenza AH1N1 en la inducción de la respuesta inflamatoria mediada por TNF-α y su efecto en la replicación viral (tesis doctoral). BUAP, Puebla Pue.

[18] Cros, J. F., & Palese, P. (2003). Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus research, 95*(1), 3-12.

[19] Resa-Infante, P., Jorba, N., Coloma, R., & Ortín, J. (2011). The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA biology, 8*(2), 207-215.

[20] Brunotte, L., Flies, J., Bolte, H., Reuther, P., Vreede, F., & Schwemmle, M. (2014). The nuclear export protein of H5N1 influenza A viruses recruits Matrix 1 (M1) protein to the viral ribonucleoprotein to mediate nuclear export. *Journal of Biological Chemistry, 289*(29), 20067-20077.

[21]Das, K., Aramini, J. M., Ma, L. C., Krug, R. M., & Arnold, E. (2010). Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nature structural & molecular biology, 17*(5), 530-538.

[22] Gorai, T., Goto, H., Noda, T., Watanabe, T., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Takano, R., Neumann, G., Watanabe, S., & Kawaoka, Y. (2012). F1Fo-ATPase, F-type proton-translocating ATPase, at the plasma membrane is critical for efficient influenza virus budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 109*(12), 4615-4620.

[23] Wang, B. X., & Fish, E. N. (2017). Interactions Between NS1 of Influenza A Viruses and Interferon-α/β: Determinants for Vaccine Development. *Journal of Interferon & Cytokine Research, 00*(00).

[24] Medina, R. A., & García-Sastre, A. (2011). Influenza A viruses: new research developments. *Nature Reviews Microbiology, 9*(8), 590-603.

[25] Lu, Y., Wambach, M., Katze, M. G., & Krug, R. M. (1995). Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology, 214*(1), 222-228.

[26] Hale, B. G., Randall, R. E., Ortín, J., & Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. Journal of *General Virology, 89*(10), 2359-2376.

[27] Hale, B. G. (2014). Conformational plasticity of the influenza A virus NS1 protein. Journal of *General Virology, 95*(10), 2099-2105.

[28] Anastasina, M., Schepens, B., Söderholm, S., Nyman, T. A., Matikainen, S., Saksela, Saelens X., & Kainov, D. E. (2015). The C terminus of NS1 protein of influenza A/WSN/1933 (H1N1) virus modulates antiviral responses in infected human macrophages and mice. *Journal of General Virology, 96*(8), 2086-2091

[29]Jackson, D., Hossain, M. J., Hickman, D., Perez, D. R., & Lamb, R. A. (2008). A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 105*(11), 4381-4386

[30] Ylösmäki, L., Fagerlund, R., Kuisma, I., Julkunen, I., & Saksela, K. (2016). Nuclear Translocation of Crk Adaptor Proteins by the Influenza A Virus NS1 Protein. *Viruses, 8*(4), 101.

[31] Krug, R. M. (2015). Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Current opinion in virology, 12*, 1-6.

[32] García-Sastre, A. (2001). Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology, 279*(2), 375-384.

[33] Jiang, W., Wang, Q., Chen, S., Gao, S., Song, L., Liu, P., & Huang, W. (2013). Influenza A virus NS1 induces G0/G1 cell cycle arrest by inhibiting the expression and activity of RhoA protein. *Journal of virology, 87*(6), 3039-3052.

[34] Akarsu, H., Burmeister, W. P., Petosa, C., Petit, I., Müller, C. W., Ruigrok, R. W., & Baudin, F. (2003). Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *The EMBO journal, 22*(18), 4646-4655.

[35] Shimizu, T., Takizawa, N., Watanabe, K., Nagata, K., & Kobayashi, N. (2011). Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP. *FEBS letters, 585*(1), 41-46.

[36] Reuther, P., Giese, S., Götz, V., Riegger, D., & Schwemmle, M. (2014). Phosphorylation of highly conserved serine residues in the influenza A virus nuclear export protein NEP plays a minor role in viral growth in human cells and mice. *Journal of virology, 88*(13), 7668-7673.

[37] O'Neill, R. E., Talon, J., & Palese, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO journal, 17*(1), 288-296.

[38] Huang, S., Chen, J., Chen, Q., Wang, H., Yao, Y., Chen, J., & Chen, Z. (2013). A second CRM1-dependent nuclear export signal in the influenza A virus NS2 protein contributes to the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Journal of virology, 87*(2), 767-778.

[39] Pohl, M. O., Lanz, C., & Stertz, S. (2016). Late stages of the influenza A virus replication cycle—a tight interplay between virus and host. *Journal of General Virology, 97*(9), 2058-2072.

[40] Nguyen, K. T., Holloway, M. P., & Altura, R. A. (2012). The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *International journal of biochemistry and molecular biology, 3(*2), 137.

[41] Neumann, G., Hughes, M. T., & Kawaoka, Y. (2000). Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *The EMBO journal, 19*(24), 6751-6758.

[42] Lara-Sampablo, A., Flores-Alonso, J. C., De Jesús-Ortega, N., Santos-López, G., Vallejo-Ruiz, V., Rosas-Murrieta, N., Reyes-Carmona, S., Herrera-Camacho, I., & Reyes-Leyva, J. (2014). Transfection of influenza A virus nuclear export protein induces the expression of tumor necrosis factor alpha. *Virus research, 185*, 1-9.

[43] Lara, Á. R. (2011). Producción de proteínas recombinantes en Escherichia coli. *Revista mexicana de ingeniería química, 10*(2), 209-223

[44] García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrazola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en Escherichia coli. *VacciMonitor, 22*(2), 30-39.

[45] Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microbial cell factories*, *14*(1), 41.

[46] Sedmak, J. J., & Grossberg, S. E. (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical biochemistry, 79*(1-2), 544-552.

[47] King, T. P. (1972). Separation of proteins by ammonium sulfate gradient solubilization. *Biochemistry, 11*(3), 367-371.

[48] Ojumu, T. V., Petersen, J., & Hansford, G. S. (2008). The effect of dissolved cations on microbial ferrous-iron oxidation by Leptospirillum ferriphilum in continuous culture. *Hydrometallurgy, 94*(1), 69-76.

[49] Santos, A. R., Ferrat, G. C., & Eichelmann, M. G. (2005). La fase estacionaria en la bacteria Escherichia coli. *Rev, Latinoamericana Microbiología, 47*, 92-101.

[50] Waugh, D. S. (2005). Making the most of affinity tags. *Trends in biotechnology, 23*(6), 316-320.

[51] Papaneophytou, C. P., & Kontopidis, G. (2014). Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in Escherichia coli: a general review. *Protein expression and purification, 94*, 22-32.

[52] Moreno, L. Y., Guerrero, C. A., & Acosta, O. (2013). Expression and purification of rotavirus structural proteins VP5* and VP8* in bacteria *E. coli* BL21 (DE3). *Revista Colombiana de Biotecnología, 15*(1), 82-97.

[53] Clark, E. D. B. (1998). Refolding of recombinant proteins. Current Opinion in Biotechnology, 9(2), 157-163.

[54] Frankel, S., Sohn, R., & Leinwand, L. (1991). The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 88*(4), 1192-1196.

[55] Burgess, R. R. (1996). [12] Purification of overproduced Escherichia coli RNA polymerase σ factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from Sarkosyl. *Methods in enzymology, 273*, 145-149.

[56] Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern clinics of Istanbul, 3*(2), 156.

[57] Cheung, R. C. F., Wong, J. H., & Ng, T. B. (2012). Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. *Applied microbiology and biotechnology, 96*(6), 1411-1420.

[58] GE Healthcare Life Sciences (2014) Size Exclusion Chromatography, Principles and Methods gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1466158841539/litdoc18102218_20161012165335.pdf

[59].Rodríguez-Cabrera, N. A., Regalado, C., & García-Almendárez, B. E. (2011). Cloning, heterologous expression and properties of a recombinant active turnip peroxidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*(13), 7120-7126.

[60] Merino, A. G. (2011). Anticuerpos monoclonales. *Aspectos básicos. Neurología, 26*(5), 301-306.

[61] Álvarez-Vallina, L. (Ed.). (2004). Anticuerpos monoclonales: realidades y perspectivas. Editorial Complutense.

[62] Gao, J., Xu, K., Sun, H., Liu, Q., Yang, J., Teng, Li, X., Chen, Z, Li, Z., & Chen, H. (2017). Generation and characterization of monoclonal antibodies against the NS1 protein of H17N10 bat influenza virus. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1-3.

[63] Melixetian, M. B., Pavlenko, M. A., Beriozkina, E. V., Kovaleva, Z. V., Sorokina, E. A., Ignatova, T. N., & Grinchuk, T. M. (2003). Mouse myeloma cell line Sp2/0 multidrug-resistant variant as parental cell line for hybridoma construction. *Hybridoma and hybridomics, 22*(5), 321-327.

[64] Badillo-Godinez, O., Gutierrez-Xicotencatl, L., Plett-Torres, T., Pedroza-Saavedra, A., Gonzalez-Jaimes, A., Chihu-Amparan, Maldonado-Gama, M., Espino-solis, G., L., & Esquivel-Guadarrama, F. (2015). Targeting of rotavirus VP6 to DEC-205 induces protection against the infection in mice. Vaccine, 33(35), 4228-4237.