



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

**“ESTABILIDAD ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA M1 DEL VIRUS PANDÉMICO DE LA INFLUENZA
A H1N1/2009: ANÁLISIS *IN VITRO* E *IN SILICO*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

PRESENTA:

MAYA MARTÍNEZ ROBERTO CARLOS

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENÍTEZ CARDOZA

DR. ABSALOM ZAMORANO CARRILLO



MÉXICO D.F. JUNIO DEL 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 11 horas del día 13 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENM y H para examinar la tesis titulada:

"Estabilidad estructural de la proteína M1 del virus pandémico de la influenza A H1N1/2009: Análisis *in vitro* e *in silico*"

Presentada por el alumno:

MAYA	MARTÍNEZ	ROBERTO CARLOS
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
Con registro: A 0 9 0 0 0 7		

Aspirante al grado de:

Maestro en Ciencias en Biomedicina Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza
Directora de Tesis


Dr. Absalom Zamorano Carrillo
Codirector de Tesis


Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama


Dr. Juan Santiago Salas Benito


Dr. César Augusto Sandino Reyes López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

Dr. César Augusto Sandino Reyes López

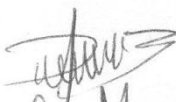


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 28 del mes de junio del año 2011, el que suscribe Roberto Carlos Maya Martínez alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular con número de registro A090007, adscrito a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza y del Dr. Absalom Zamorano Carrillo y cede los derechos del trabajo intitulado “Estabilidad estructural de la proteína M1 del virus pandémico de la influenza A H1N1/2009: Análisis *in vitro* e *in silico*”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **bax_bcl2@yahoo.com.mx** o **ben1972uk@gmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Roberto C. Maya Mtz

L.B.E. Roberto Carlos Maya Martínez

AGRADECIMIENTOS

Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza no encuentro palabras para agradecerle por todo su apoyo académico, así como también por sus sabios consejos muy acertados para que este humilde servidor mejore día con día, muchísimas gracias jefa

Dr. Absalom Zamorano Carrillo quisiera agradecerle por su apoyo académico que siempre me brindo durante mi estancia en este posgrado

Dr. César Augusto Sandino Reyes López gracias por su apoyo académico

M. en C. Jorge Rosas por todo tu apoyo incondicional para aclarar mis dudas durante esta larga travesía

M. en C. Rosana Fiorentino Pérez por brindarme tu mano amiga de manera incondicional desde que tuve la dicha de conocerte

A CONACyT por haberme otorgado la beca para poder continuar con mis estudios y poder obtener este grado académico

A mis compañeros de laboratorio César, Brenda, Oscar por apoyarme en esta larga travesía

DEDICATORIA

A mis padres: Carmen y Roberto por todo su amor, apoyo y consejos que siempre me han brindado y que me han servido para llegar hasta donde me encuentro actualmente, solo les reitero que todavía nos falta mucho camino por recorrer, pero estoy muy seguro que llegaremos juntos a esa meta planeada, los quiero mucho

A mi hermana Ma. Guadalupe gracias por estar conmigo siempre en todo momento y por luchar para que nuestra familia este siempre unida, te quiero mucho

A mi novia Ariadna Berenice, este trabajo también es tuyo morenita, ya que sin tu apoyo, comprensión y amor, este camino hubiera sido muy tedioso, además quisiera agradecerte por darme la oportunidad de conocerte y de darme cuenta que eres única y difícil de encontrar. Gracias morenita recuerda que siempre que te llevo conmigo, te amo Bere

ÍNDICE TEMÁTICO

	Pagina
ABREVIATURAS	I
RESUMEN	II
ABSTRACT	III
I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1.-Patología del virus	1
I.2.- Biología del virus de la influenza	3
I.2.1.- Estructura y organización del virus	3
I.2.2.- Genoma del virión	5
I.3.- Ciclo replicativo	5
I.3.1.- Interacción del virión con su huésped	5
I.3.2.- Entrada del virión	5
I.3.3.- Síntesis del vARN viral y ensamblaje de los virus	5
I.3.4.- Liberación de la partícula viral recién formada hacia el espacio extracelular	6
I.4.- Importancia biológica de la proteína de matriz M1	7
I.5.- Síntesis de la proteína M1	8
I.5.1.- M1 que se importa hacia el núcleo	8
I.5.2.- M1 que se dirige hacia la membrana celular	9
I.6.- Simulaciones de la dinámica molecular de proteínas	11
I.7.- Desplegamiento de proteínas evaluado por simulaciones por dinámica Molecular	11

II.- ANTECEDENTES	13
III.- JUSTIFICACIÓN	16
IV.- OBJETIVOS	18
IV.1.- Objetivo General	18
IV.2.- Objetivos Particulares	18
IV.2.1.- <i>In vitro</i>	18
IV.2.2.- <i>In silico</i>	18
V.- METODOLOGÍA	19
V.1.- <i>in vitro</i>	19
V.1.1.- Obtención del gen de M1 del virus de la influenza A H1N1 de la pandemia de México 2009	19
V.1.2.- Condiciones de PCR para amplificar el gen de M1	19
V.1.3.- Purificación del amplificado (gen M1) obtenido por PCR	20
V.1.4.- Clonación del gen M1 en el vector pJET1.2	20
V.1.5.- Transformación de células E. coli DH5- α	21
V.1.6.- Minipreps de células DH5 – α -pJET1.2 / pET19b-M1	21
V.1.7.- Transformación de células competentes de expresión de <i>E. coli</i> de la cepa BL21 DE3pLyS y Rosetta gami	21
V.1.8.- Ensayos de sobre-expresión de la proteína M1	21
V.1.9.- Purificación de la proteína M1	22
V.1.10.- Purificación de cuerpos de inclusión	22
V.1.11.- Purificación de la proteína M1 solubilizada en 4 M de urea	23

V.2.- <i>In silico</i>	24
V.2.1.- Selección del Gen M1 y posteriormente la proteína M1 del virus de la influenza A/H1N1/2009 exclusiva de México	24
V.2.2.- Validación del modelo tridimensional de M1	24
V.2.3.- Simulación por dinámica molecular del modelo 3D de M1	24
V.2.4.- Análisis de los datos de la simulación por dinámica molecular	25
VI.- RESULTADOS	26
VI.1.- <i>In vitro</i>	26
VI.1.1.- Caracterización del gen M1	26
VI.1.2.- Amplificación del gen M1	28
VI.1.3.- subclonación del gen M1 en el vector pJET1.2	30
VI.1.4.- Subclonación del gen M1 en el vector de expresión pET19b-m	34
VI.1.5.- Expresión de la proteína M1	36
VI.1.6.- Purificación de la proteína M1	38
VI.1.7.- Caracterización de las estructuras secundarias de M1	40
VI.2.- <i>In silico</i>	41
VII. RESUMEN DE RESULTADOS	65
VII.1.- <i>In vitro</i>	65
VII.2.- <i>In vitro</i>	65

VIII. DISCUSIÓN	67
VIII.1.- <i>In vitro</i>	67
VIII.2.- <i>In silico</i>	70
IX.- CONCLUSIONES	74
IX.1.- <i>In vitro</i>	74
IX.2.- <i>In silico</i>	74
IX.3.- <i>In vitro</i> e <i>in silico</i>	74
X.- PERSPECTIVAS	75
X.1.- Estudios <i>in vitro</i>	75
X.2.- Estudios <i>in silico</i>	75
XI.- APENDICE A	76
XI.1.- Figuras adicionales	76
XI.1.1.- Mapas de contacto de las estructuras finales de la simulación	76
XII.- APENDICE B	77
XII.1.- Soluciones y Reactivos	77
XII.1.1.- Medios de cultivo	77
XII.1.2.- Antibióticos	77
XII.1.3.- Amortiguadores	77
XII.1.4.- Soluciones	78
XII.2.- Células de <i>E. coli</i>	79
XII.3.- Vectores	79
XII.4.- Enzimas	81

XII.5.- Kits moleculares utilizados	82
XIII.- BIBLIOGRAFÍA	83

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS	Página
Tabla I.2.1.1 El genoma del virus de la influenza A/Puerto Rico /8/1934(H1N1), así como las proteínas que codifican	4
Tabla VI.2.1 Distancias que mantienen los cuatro puentes salinos que comparten las tres temperaturas de simulación	56

FIGURAS

Figura I.1.1 Casos de influenza A/H1N1 reportados durante el periodo crítico de la infección abril – julio del 2009	2
Figura I.2.1 Estructura del virus de la influenza	3
Figura I.3.4.1 Liberación del virus de la influenza de su huésped	7
Figura I.4.1 Regiones de la proteína M1 relacionadas con una función biológica	10
Figura VI.1.1 Análisis del fragmento clonado en el vector pLIC-HALO	27
Figura VI.1.2 Oligonucleótidos para poder amplificar y subclonar el gen M1	28
Figura VI.1.3 Amplificación del gen M1	29
Figura VI.1.4 Purificación del gen M1	29
Figura VI.1.5 PCR confirmatoria de las clonas 10, 12 y 23	30
Figura VI.1.6 Liberación del inserto de los vectores de las clonas 10, 12 y 23	31
Figura VI.1.7 Análisis de los sitios de restricción del plásmido pJET1.2 extraído de la clona 23	32
Figura VI.1.8 Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del gen M1 clonado en el vector pJET1.2, con el segmento 7 del virus de la influenza A/H1N1/New York_1682/2009	34

Figura VI.1.9	Clonación del gen M1 en el vector pET19b	35
Figura VI.1.10	Análisis de la secuencia de nucleótidos clonada en el vector pET19b-M1	36
Figura VI.1.11	Cinética de expresión de la proteína M1 en la cepa de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pLyS	37
Figura VI.1.12	Cinética de expresión de la proteína M1 en la cepa de <i>E. coli</i> Rosetta-gami	38
Figura VI.1.13	Purificación de M1 en condiciones desnaturalizantes 4 M urea	39
Figura VI.1.14	Western blot anti histidinas del amino terminal de M1	40
Figura VI.1.15	Espectros de dicroísmo de la proteína M1	40
Figura VI.2.1	Secuencia consenso del gen M1 del virus de la influenza A/H1N1/2009-Mexico	41
Figura VI.2.2	Secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la secuencia consenso del gen M1	42
Figura VI.2.3	Modelo tridimensional de la proteína M1	43
Figura VI.2.4	Gráfico de Ramachandran del modelo tridimensional de la proteína M1	44
Figura VI.2.5	RMSD de la cadena principal de M1 a tres diferentes temperaturas de simulación	45
Figura VI.2.6	RMSF de los C- α de M1	46
Figura VI.2.7	Radio de giro de M1	47
Figura VI.2.8	Área de exposición al solvente (SASA) de M1	48
Figura VI.2.9	Enlaces de hidrógeno que presenta M1 durante la simulación de la dinámica molecular	48
Figura VI.2.10	Mapas de los cambios de estructura secundaria de M1, a través de los 20 000 ps de simulación	50

Figura VI.2.11	Superposición de las estructuras obtenidas al final de 20 000 ps de simulación de 300 y 400 K	52
Figura VI.2.12	Superposición de las estructuras obtenidas al final de 20 000 ps de simulación, entre 300 y 500 K	54
Figura VI.2.13	Estructuras 3D, representativas de los aminoácidos que forman los cuatro puentes salinos que se mantienen a las tres temperaturas de simulación (300, 400 y 500 K)	55
Figura VI.2.14	Imágenes de las hélices H1, H4, H6 y H7 tomadas a diferentes tiempos de simulación de la dinámica molecular a una temperatura de 300 K	59
Figura VI.2.15	Imágenes de las hélices H1, H4, H6 y H7 tomadas a diferentes tiempos de la simulación por dinámica molecular a una temperatura de 400 K	61
Figura VI.2.16	Fotos de las hélices H1, H4, H6 y H7 tomadas a diferentes tiempos de la simulación por dinámica molecular a una temperatura de 500 K	63
Figura VI.2.17	Exposición al solvente de las hélices H1 y H4, 20 000 ps de simulación a una temperatura de 500 K	64
Figura VII.2.1	Exposición al solvente de las H1 y H4, después de una simulación a 500 K	66
Figura VIII.1.1	Comparación de aminoácidos entre la proteína M1 de dos diferentes cepas	69
Figura XI.1.1.	Mapas de contacto de las estructuras obtenidas al final de los 20 000 ps de simulación	76

ABREVIATURAS

- **HA:** Hemaglutinina
- **NA:** Neuraminidasa
- **M1:** Proteína de Matriz
- **vRNP:** Complejo Ribonucleoproteico Viral
- **A/H1N1:** Virus de la Influenza del tipo A H1N1
- **A/H1N1/2009:** Virus pandémico de la influenza del tipo A H1N1 del año 2009
- **A/H1N1/New York_1682/2009:** Virus pandémico de la influenza del tipo A H1N1 del año 2009, aislado del paciente 1682 de la ciudad de Nueva York
- **A/H3N2:** Virus de la Influenza del tipo A H3N2
- **A/H5N2:** Virus de la Influenza del tipo A H5N1
- **SSA:** Secretaria de Salud
- **sRNA:** Cadena sencilla de ARN
- **PB1:** Subunidad Básica 1 de la ARN polimerasa viral
- **PB1-F2:** Forma alternativa de la Subunidad Básica 1 de la ARN polimerasa viral
- **PB2:** Subunidad Básica 2 de la ARN polimerasa viral
- **PA:** Subunidad Ácida de la ARN polimerasa viral
- **NS1:** Proteína no Estructural 1
- **NS2 ó NEP:** Proteína no Estructural 2
- **UTR:** Región no traducida

- **cARN:** ARN complementario
- **Crm1:** De las siglas en inglés Chromosome Region Maintenance 1
- **SLN:** Señales de Localización Nuclear
- **H2A, H2B, H3, H4 y H1:** Histonas
- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- **M2:** Proteína de matriz del tipo 2 (canal iónico)
- **aa:** Aminoácido
- **NCBI:** Centro Nacional de Información Biotecnológica
- **dNTPs:** Desoxirribonucleótidos Trifosfato
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **IPTG:** Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranosido
- **ON:** Toda la noche
- **kDa:** Mil Dalton
- **NiNTA:** Resina de níquel – agarosa
- **α -his:** Anti histidina
- **RMSD:** Desviación Cuadrática Media

RESUMEN

El virus de la influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Su genoma está formado por ocho segmentos de RNA de cadena negativa (sencilla). El virus de tipo A es el principal involucrado en las pandemias a nivel mundial, debido a la recombinación genética entre distintos tipos virales, denominados cambios antigénicos (de sus siglas en inglés “shifts”). Mientras que cambios puntuales de aminoácidos, denominados deriva antigénica (de sus siglas en inglés “drifts”) son los principales causales de las epidemias regionales estacionales predominantemente en el periodo invernal.

La familia *Orthomyxoviridae* se caracteriza por incluir virus envueltos por una bicapa lipídica que tiene ancladas tres proteínas transmembranales, las cuales tienen orientado su sitio activo hacia la parte externa del virión: Hemaglutinina (HA), Neuraminidasa (NA) y la proteína de matriz (M) 2. Por otro lado, la proteína de matriz (M) 1 es la más abundante en la estructura del virus ya que forma la cápside del mismo. M1 está compuesta por 252 aminoácidos y se ha dilucidado la estructura cristalográfica de los primeros 164 aminoácidos. Estos muestran una estructura que contiene 9 hélices- α , enumeradas desde H1 hasta H9. La estructura tridimensional de los 88 aminoácidos restantes hasta el momento se desconoce. M1 es una proteína multifuncional que participa en la formación estructural del virión y en la translocación del complejo ribonucleoproteico (vRNP) del núcleo al citoplasma del hospedero, durante su ciclo replicativo. Los principales estudios de M1 se han enfocado en describir su estructura y sus funciones, sin embargo poco se sabe sobre su estabilidad estructural y de los cambios conformacionales que adopta para realizar cada una de sus funciones. Por lo tanto, en este trabajo se realizó un estudio de la estabilidad y la plasticidad tanto *in vitro* como *in silico* de la proteína M1. En el caso de los estudios *in vitro*, el gen de M1 se clonó en un vector de expresión a partir del segmento 7, se sobre-expresó en un sistema bacteriano y se purificó hasta homogeneidad, bajo condiciones desnaturalizantes. En lo que respecta a los estudios *in silico*, se obtuvo un modelo de la proteína completa y se realizaron simulaciones de dinámica molecular a distintas temperaturas. La proteína M1 fue en general muy estable cuando se analizó en una simulación de la dinámica molecular a una temperatura de 300 y 400 K, caso que no ocurrió con la simulación de 500 K. Además en los estudios *in silico*, también fue analizada de manera específica la estabilidad y dinámica de aquellas estructuras de M1 a las que se les ha atribuido un fuerte impacto funcional, ya sea en la interacción con la membrana (H1, H4, H6 y H7) o en la participación en diversos

procesos dentro del núcleo de la célula huésped como es el caso de la H6. Donde encontramos que la H6 es la que tiene un elevado nivel de estabilidad después de una simulación de la dinámica molecular a una temperatura de 500 K. También pudimos determinar un posible mecanismo por el cual la H1 y H4 estarían exponiéndose al solvente para poder interactuar con la membrana.

ABSTRACT

Influenza virus belongs the *Orthomyxoviridae* family. Its genome consists of eight segments of negative single strand RNA. The type A virus is the principal involved in global pandemics, due to genetic recombination between different viral types, called "antigenic shifts." While specific changes in amino acids called "antigenic drifts" are the main causes of seasonal regional epidemics, predominantly in winter periods. Viruses of the *Orthomyxoviridae* family possess a lipid bilayer envelope that anchors three transmembrane proteins, which have their active sites oriented toward the outside of the virion: hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA) and matrix protein (M) 2. On the other hand, M1 is the most abundant in the structure of the virus capsid. M1 is composed of 252 amino acids and nowadays the crystal structure of the first 164 amino acids has been solved, but not that of the whole polypeptide. They show a structure that contains 9 α -helices, numbered from H1 to H9. The three dimensional structure of the 88 remaining amino acids are so far unknown. M1 is a multifunctional protein involved in the formation of the virion when the virus is dormant and in the translocation of the ribonucleoprotein complex (vRNP) from the nucleus to the cytoplasm of the host during its replication cycle. All studies on the M1 protein have been focused on describing its structure and functions, yet little is known about its structural stability and conformational changes adopted for each of its functions. Therefore in this work, we studied the stability and plasticity *in vitro* and *in silico* of protein M1. Concerning *in vitro* studies, the gene codifying M1 was cloned in an expression vector. Subsequently, it was over-expressed in a bacterial system and the recombinant protein was purified to homogeneity at denaturing conditions. Regarding *in silico* studies, a model of the three-dimensional structure of the whole polypeptide of M1 was constructed, and it was analysed by molecular dynamics simulations at three different temperatures (300, 400 and 500 K). M1 was generally very stable when tested in a molecular dynamics simulation at a temperature of 300 and 400 K, whereas at 500 K it lost mostly its native conformation. Results from molecular dynamic simulations were also useful to understand conformational changes involved in the interaction of M1 with host membrane (H1, H4, H6 and H7) and its participation in various processes within the host cell nucleus as in the case of H6. We found that H6 is one of the most stable regions of M1 even after 20000 ps of simulation at a temperature of 500 K. Our results might explain how H1 and H4 might migrate from the hydrophobic core of the protein towards the solvent and consequently interact with the host membrane during influenza infection.

I.- INTRODUCCIÓN

El virus de la influenza es el agente causal de agudas enfermedades respiratorias denominadas influenza, este virus pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Los virus de la influenza A, B y C representan a tres de los cinco géneros de esta familia y se clasifican de esa manera de acuerdo al grado de antigenicidad de sus proteínas NP (nucleoproteínas) y M1 (proteína de matriz). Los orthomixovirus son virus de RNA segmentado de polaridad negativa, constituido por 8 (en los tipos A y B) y 7 (en los del tipo C) segmentos lo cuales codifican para 11 proteínas (Palese *et al.*, 1976).

El virus de la influenza del tipo A es el de mayor importancia debido a que infecta a una gran variedad de especies de aves y mamíferos, además de afectar al ser humano. Es el agente causal de morbilidad y mortalidad de una gran cantidad de seres humanos durante epidemias anuales (periodos invernales). Se calcula que las epidemias por influenza causa trastornos respiratorios de entre 30 y 50 millones de seres humanos, siendo los niños los más susceptibles (20%) y de los cuales fallecen entre 250 a 500 mil seres humanos alrededor del mundo (Suzuki, *et al.*, 2005). En humanos el virus infecta a células del tracto respiratorio alto y bajo causando severos padecimientos en el huésped entre los que destacan: fiebre, congestión del tracto respiratorio alto y faringitis. Algunas ocasiones la infección causada por influenza A se puede complicar a causa de subsecuentes infecciones de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*.

I.1.-Patología del virus

La influenza A serológicamente está definida de acuerdo a sus proteínas de superficie HA y NA. 16 subtipos de HA y 9 subtipos de NA se han identificado en aves, (especialmente en aves acuáticas) (Kaye *et al.*, 2005).

Cuando dos o más cepas del virus de la influenza A infectan a la misma célula, puede facilitar el surgimiento de nuevas cepas virales debido a que el genoma del virus es segmentado. Los cambios antigénicos “shifts” se originan cuando las nuevas cepas virales son generadas por intercambios de segmentos completos; mientras que los ligeros cambios puntuales de aminoácidos sobre la proteína son denominados cambios antigénicos “drift”. La HA y NA son muy susceptibles de sufrir cambios antigénicos “drift”, al parecer dichos cambios están relacionados a la tasa de mutación ($1/10^4$ bases por ciclo replicativo) con la que replica el genoma viral las ARN polimerasas virales.

Cinco grandes pandemias de influenza han afectado a la población humana: en 1918 surgió la pandemia A/H1N1 (aviar) la más devastadora que se tiene registrada causando un deceso de alrededor de 50 millones de personas, a nivel mundial; esta fue conocida como la influenza española. La segunda pandemia de A/H2N2 registrada data de 1957 en Asia, la tercera pandemia A/H3N2 surgió en Hong Kong en 1968, la cuarta pandemia de A/H5N1 (aviar) de 1997 en Hong Kong y por último la quinta pandemia A/H1N1 en 2009 la cual afectó a varios países alrededor del mundo, causando un número considerable de muertes. En el caso particular de México durante los meses críticos de la infección por influenza en el periodo de abril –julio del 2009 se registraron alrededor de 2 059 casos confirmados y 56 defunciones (ver figura I.1.1). Sin embargo del 2009 al 2010 después de un año de la infección los casos acumulados aumentaron a 72 548 casos confirmados y 1316 defunciones, según cifras reportadas por la secretaria de salud. (SSA, 2009).

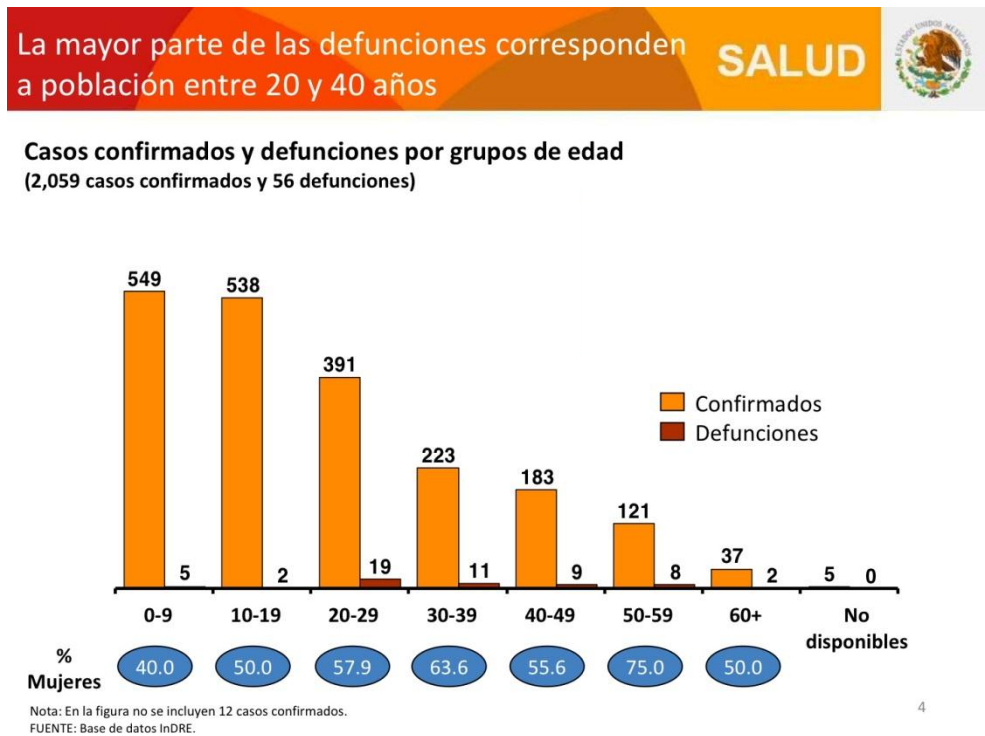


Figura I.1.1. Casos de influenza A/H1N1 reportados durante el periodo crítico de la infección abril – julio del 2009. En caso particular las mujeres fueron muy vulnerables a la infección

I.2.- Biología del virus de la influenza

I.2.1.- Estructura y organización del virus

Virus de la influenza, es un virus envuelto y esférico con un diámetro de 100 nm, tiene un genoma segmentado de sRNA de polaridad negativa, consta de 8 segmentos que codifican para 11 proteínas virales. El segmento 1 codifica para la polimerasa PB2, el segmento 2 por el proceso de splicing codifica para las polimerasas PB1 y PB1-F2, el segmento 3 codifica para la polimerasa PA, el segmento 4 codifica para la hemaglutinina (HA), el segmento 5 codifica para la nucleoproteínas NP, el segmento 6 codifica para la neuraminidasa (NA), el segmento 7 sufre splicing y codifica para las proteínas de matriz M1 y M2 (canal de protones) y por último el segmento 8 mediante splicing genera dos proteínas no estructurales NS-1 y NEP; ver la tabla I.2.1.1 se muestra a detalle características del genoma y proteína virales de la influenza A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) (Bouvier, *et al.*, 2008)

La envoltura viral consiste en una bicapa lipídica que tiene ancladas tres proteínas transmembranales, las cuales tienen orientado su sitio activo hacia la parte externa del virión: Hemaglutinina (HA), Neuraminidasa (NA) y M2.

Así mismo, la proteína de matriz (M1) es la más abundante en la estructura del virus y forma una unión entre la envoltura del virión y el complejo vRNP (está integrado por tres polimerasas: PA, PB1 y PB2; proteínas NP y el ARN viral) (ver figura I.2.1.1).

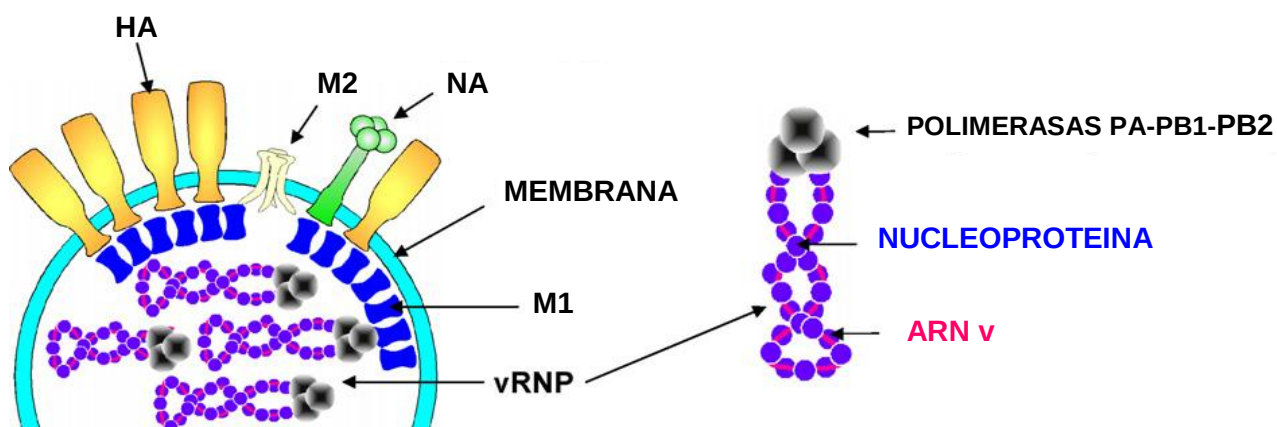


Figura I.2.1. Estructura del virus de la influenza. Del lado derecho se representa al vRNP (<http://www.biondvax.com/128084/Influenza>)

Tabla I.2.1.1. El genoma del virus de la influenza A/Puerto Rico/8/1934(H1N1), así como las proteínas que codifican (Bouvier *et al.*, 2008)

Segmento	Longitud del segmento (nucleótidos)	Proteínas que codifica	Longitud de la proteína	Función de la proteína
1	2341	PB2	259	Subunidad de la polimerasa; participa en: - El reconocimiento del cap del mRNA
2	2341	PB1	757	Subunidad de la polimerasa; que participa en: - La elongación del RNA y tiene actividad de endonucleasa
		PB1-F2	87	Subunidad de la polimerasa; tiene actividad pro-apoptótica
3	2233	PA	716	Subunidad de la polimerasa; tiene actividad de proteasa
4	1778	HA	550	Glicoproteína de superficie; es muy antigénica; participa en: - La unión con el receptor viral - En el proceso de fusión de membranas
5	1565	NP	498	Proteína de unión a RNA, participa en la regulación e importación nuclear del RNA viral
6	1413	NA	454	Glicoproteína de superficie; tiene actividad de sialidasa y participa en: - La liberación de las partículas víricas
7	1027	M1	252	Proteína de matriz; participa en: - La interacción con complejo ribonucleoproteico del virus (vRNP) - La regulación de la exportación nuclear de vRNP - El proceso de favorecer la curvatura de la membrana para formar la partícula viral
		M2	97	Canal de protones; participa en: - El desnudamiento del virus - El ensamblaje del virus
8	890	NS1	23	Proteína antagonista del interferón; participa en: - La regulación de la expresión génica del hospedero
		NEP/NS2	121	Participa en la exportación nuclear del RNA viral

I.2.2.- Genoma del virión

Cabe resaltar que los segmentos (del 1 al 7 o del 1 al 8 en su caso) tienen regiones UTR no traducidas, las cuales son altamente conservadas en todos ellos. En lo que respecta a las regiones no traducidas 5' de todos los segmentos que conforman el genoma viral, hay 13 nucleótidos (AGUAGAAACAAGG), mientras que en las regiones no traducidas 3' se tienen 12 nucleótidos (CCUGCUUUCGCU) (Lamb, *et al.*, 1991).

1.3.- Ciclo replicativo

1.3.1.- Interacción del virión con su huésped

La hemaglutinina es un homotrimerio que reconoce al ácido N-acetilneuramínico (mejor conocido como ácido siálico) que se encuentra sobre la superficie de la célula hospedera. El ácido siálico es un monosacárido de nueve carbonos, comúnmente se encuentra como residuo terminal de muchos glucoconjugados, formando enlaces α -2,3 o α -2,6 con la galactosa del carbohidrato raíz. La presencia de un tipo de enlace específico en las glicoproteínas o glucolípidos, va a depender de la estirpe celular. Solo estos dos tipos de enlace son reconocidos por la HA (subtipos del 1 al 16). El epitelio de la tráquea de aves contiene ácido siálico con enlaces α -2-3, mientras que en humanos se encuentra principalmente ácido siálico con enlaces α -2,6. Por otro lado, en el tracto respiratorio de cerdos se expresan los dos tipos (en proporciones iguales) de receptores. Por tal motivo los cerdos son considerados organismos que permiten la recombinación de cepas virales de influenza y por ende el surgimiento de nuevas cepas con un potencial altamente patógeno.

I.3.2.- Entrada del virión

Después del reconocimiento ligando-receptor el virus entra al huésped vía endosoma, y posteriormente hay una acidificación gradual del mismo, así como del interior del virión. El proceso anterior genera un cambio conformacional en HA de tal manera que se lleva a cabo el proceso de ataque a la membrana, provocando la fusión de membranas (endosomal y viral), y con ello se favorece la liberación de vRNP hacia el citoplasma del hospedero.

I.3.3.- Síntesis del ARN viral (vARN) y ensamblaje de los virus

Una vez que el vRNP se encuentra en el citoplasma del hospedero, este se transporta hacia el núcleo mediante el complejo del poro nuclear (Cras *et al.*, 2003), utilizando las señales de localización nuclear presentes en la proteína NP. Una vez

que el vRNP se encuentran en el núcleo, el complejo de polimerasas: PB1, PB2 y PA utilizan la cadena negativa del vARN (genoma de ARN del virus) como templado para la síntesis de especies positivas de ARN las cuales sirven como molde para:

- a) La síntesis de mRNA (virales, a los cuales se les agrega un **cap** en el extremo 5' y una cola de poli A en su extremo 3')
- b) Generar ARN complementario (cARN) que sirve como molde para la síntesis del genoma viral (copias de RNA de polaridad negativa).

Las cadenas de mRNA de origen viral son procesados de igual manera que los mRNA del huésped. En primera instancia se generan las proteínas tempranas de la influenza: las subunidades de la polimerasa viral (PB1, PB2 y PA), las proteínas NEP, M1, NS1 y NS2. Finalmente se sintetizan las proteínas estructurales HA, NA y M2 y de manera paralela a ello se sintetiza el genoma viral, para formar el vRNP. El vRNP necesitan ser trasladadas del núcleo al citoplasma mediante la vía celular Crm1 (de sus siglas en inglés Chromosome Region Maintenance 1, este es un receptor que media la importación/exportación de proteínas del núcleo celular) (Elton *et al*, 2001) y la proteína M1 en colaboración con NP y NEP; son las encargadas de realizar dicho proceso. Además M1 mediante un proceso aun no especificado favorece el transporte del complejo vRNP hacia región de la membrana donde se encuentran las proteínas estructurales del virus; una vez reunidos todos los componentes virales en la región apical (de células polarizadas) de la membrana plasmática, se inicia el proceso de liberación de las partículas virales hacia el espacio extracelular.

I.3.4.- Liberación de la partícula viral recién formada hacia el espacio extracelular

Una vez que se encuentran reunidos todos los componentes (proteínas de superficie, 8 segmentos de vRNP y una gran cantidad de la proteína M1) M1 inicia con el proceso de formación de la partícula viral, manteniendo interacciones entre la membrana del virus y con el complejo vRNP; además de interacciones M1-M1. Asimismo, M1 promueve el cierre de la partícula viral, para su posterior liberación de la célula huésped de la zona apical en células polarizadas (Nayak *et al.*, 2009) (ver figura I.3.4.1).

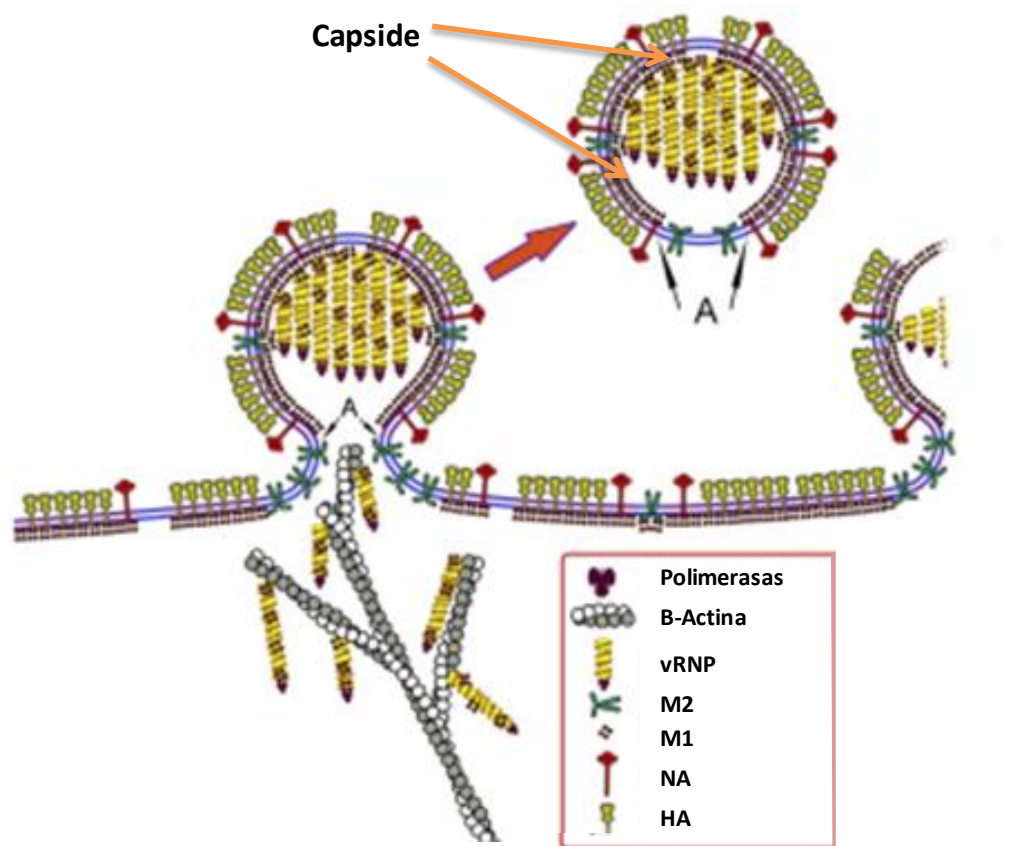


Figura I.3.4.1 Liberación del virus de la influenza de su huésped. Este proceso se inicia con la reunión de las proteínas de superficie recién sintetizadas en regiones ricas de colesterol de la membrana del huésped, posteriormente se da la síntesis del resto de los componentes virales, estos se dirigen hacia donde se encuentran ancladas las proteínas de superficie del virus. En primera instancia la proteína M1 favorece el inicio de la liberación de la partícula viral y posteriormente el cierre de la partícula viral. (Nayak *et al.*, 2009)

I.4.- Importancia biológica de la proteína de matriz M1

M1 es la proteína más abundante de la estructura del virus de la influenza (Compans *et al.*, 1975). M1 desempeña un papel muy importante en el soporte, anclaje y protección del genoma viral, debido a que se forma una cápside alrededor de dicho genoma (ver figura I.2).

Así mismo, M1 tiene participación en el ciclo replicativo del virus. En primer lugar cuando el virus entra al huésped vía endosoma - pH dependiente y este es gradualmente acidificado, al igual que el interior del virión. Entonces se promueve un cambio conformacional de M1 que favorece la liberación del vRNP de M1 hacia el citoplasma de la célula huésped (Zhirnov *et al.*, 1990) para su posterior migración hacia el núcleo del huésped para llevar a cabo la replicación del genoma viral.

Una vez que se encuentran en el núcleo el vRNP, se inicia la replicación del genoma y la síntesis de proteínas virales.

I.5.- Síntesis de la proteína M1

En específico la proteína M1 se sintetiza mediante splicing alternativo a partir del segmento 7.

Una proporción de la proteína M1 que se ha sintetizado de novo se dirige hacia: el núcleo celular y otra hacia la membrana celular (hacia el sitio de ensamblaje viral). Actualmente se desconoce que señales promueven que M1 se dirija hacia una u otra localización celular.

I.5.1.- M1 que se importa hacia el núcleo

El proceso de importación de M1 se ve favorecido gracias a que esta proteína posee en su secuencia el péptido 101 RKLKR 105 (dentro de la hélice 6) señales de localización nuclear (SLN) las cuales son reconocidas por proteínas del complejo del poro nuclear, este reconocimiento favorece la importación de M1 al núcleo. M1 va a desempeñar varias funciones en el núcleo, entre las que destacan:

- 1) **Regulación de la transcripción del genoma viral:** Se ha demostrado que M1 es una proteína de unión a ARN de cadena sencilla (Wakefield *et al.*, 1989). En estudios *in vitro* se ha observado que M1 inhibe la síntesis de ARN catalizado por el complejo ribonucleoproteico (RNP) (aislado de virus de la influenza) (Zvonarjev *et al.*, 1980). Hay una inhibición cercana al 50%. También se ha reportado que la región de M1 que inhibe la transcripción se encuentra dentro del C-terminal (últimas 2/3 partes de M1 (Ye *et al.*, 1987). Aunque en otros trabajos proponen que los aminoácidos críticos de M1 para inhibición de la transcripción está dada por residuos cercanos a los aminoácidos 70 y 140 (Hankins *et al.*, 1989) (ver región de M1, responsable de esta función en la figura I.4.1).
- 2) **Interacción de M1 con caspasas:** Mediante estudios *in vitro* M1 interactúa con la caspasa 8 (esta proteína después de ser activada posee una actividad proapoptótica). Se ha propuesto que M1 podría inhibir la activación de la caspasa 8 y por lo tanto se estaría inhibiendo el proceso de apoptosis (Zhirnov *et al.*, 2002) (ver región de M1, responsable de esta función en la figura I.4.1).
- 3) **Interacción de M1 con histonas:** Mediante un estudio *in vitro* se ha demostrado que M1 interactúa con las histonas H2A, H2B, H3, H4 y débilmente con H1 (Zhirnov *et al.*, 1997). Al parecer la interacción M1-histona se da por

fuerzas electrostáticas y tanto la porción amino (los 9 primeros KDa), como la carboxilo (los últimos 18 KDa) de M1, tienen la misma capacidad de unirse a las histonas. Hasta el momento, no existen estudios *in vivo* que describan los efectos que podría tener la interacción de M1-nucleosoma (octámero compuesto de un par de cada una de las siguientes histonas: H2A, H2B, H3 y H4; su función es empaquetar el ADN del huésped). Sin embargo, se propone que M1 podría estar regulando la transcripción de algunos de los genes del huésped durante el ciclo replicativo del virus de la influenza (ver región de M1, responsable de esta función en la figura I.4.1).

- 4) **Interacción de M1 con el vRNP:** M1 se asocia fuertemente al vRNP tanto en la estructura del virus, así como en el vRNP que se forma dentro del núcleo de la célula infectada (Rees *et al.*, 1981). La importancia de la presencia de M1 y posteriormente la interacción de M1 con el vRNP, radica en que se favorece la exportación del núcleo celular de este al citoplasma, donde posteriormente es transportada hacia el sitio de ensamblaje viral (generalmente son zonas características de la membrana celular las cuales son ricas en colesterol y donde previamente se han embebido las proteínas de superficie del virus de la influenza, tales como HA, NA y M2) mediante un mecanismo aún desconocido. Además la unión M1-vRNP en el citoplasma podría evitar el reingreso del vRNP al núcleo (Whittaker, *et al.*, 1996) (ver región de M1, responsable de esta función en la figura I.4.1).

I.5.2.- M1 que se dirige hacia la membrana celular

Se van a encontrar dos poblaciones de M1 que se dirigen hacia la membrana celular, específicamente hacia el sitio de ensamble viral: una porción de la proteína que es sintetizada de novó y otra que se encuentra acomplejada con el vRNP. Ambas forman homo-multímeros en el sitio de ensamble viral para formar la cápside viral y por ende la formación del virus.

Se ha propuesto que ambos tipos de poblaciones de M1 pueden interaccionar directamente con la membrana mediante la inserción de algunas porciones de la proteína. Sin embargo, existe controversia acerca de la región de M1 que podría interaccionar directamente con la membrana. Por ejemplo Gregoriades y col. 1981, proponen que 13 aminoácidos no cargados (GILGFTLVPS) que corresponden a la hélice-4 y 20 aminoácidos (EISLSYSAGALALASCMGLI) hidrofóbicos que

corresponden a la hélice-7, son los responsables de la inserción en la membrana (Gregoriades *et al.*, 1981). En 1997 se determinó la primera estructura cristallográfica de la región N-terminal (primeros 162 aa) de la proteína M1 (Sha *et al.*, 1997a), con lo que fue posible proponer las regiones de la proteína que podrían ser las responsables de interaccionar con la membrana. Por ejemplo Sha y Luo 1997 propusieron que los residuos hidrofóbicos de las hélices-1 y -4 podrían insertarse en la membrana. No obstante en un trabajo reciente donde se trabajó con partículas virales intactas se pudo observar que la región N-terminal de las hélices-4 y -7 son las porciones que interactúan con la membrana (Shishkov *et al.*, 1999). Recientemente Ruigrok R. y col., en el 2000 demostraron mediante estudios *in vitro* que gran parte de la proteína M1 utiliza su región polibásica de la hélice-6, para interaccionar electrostáticamente con las cabezas de los fosfolípidos (Ruigrok *et al.*, 2000), por lo tanto, es mínima la cantidad de M1 que se inserta en membrana. De acuerdo a estos estudios, podemos inferir que las regiones de la proteína que interaccionan con la membrana podrían incluir a: H1, H4, H6 (mediante interacción electrostática) y H7 (a través de interacciones hidrofóbicas) (ver región de M1, responsable de esta función en la figura I.4.1).

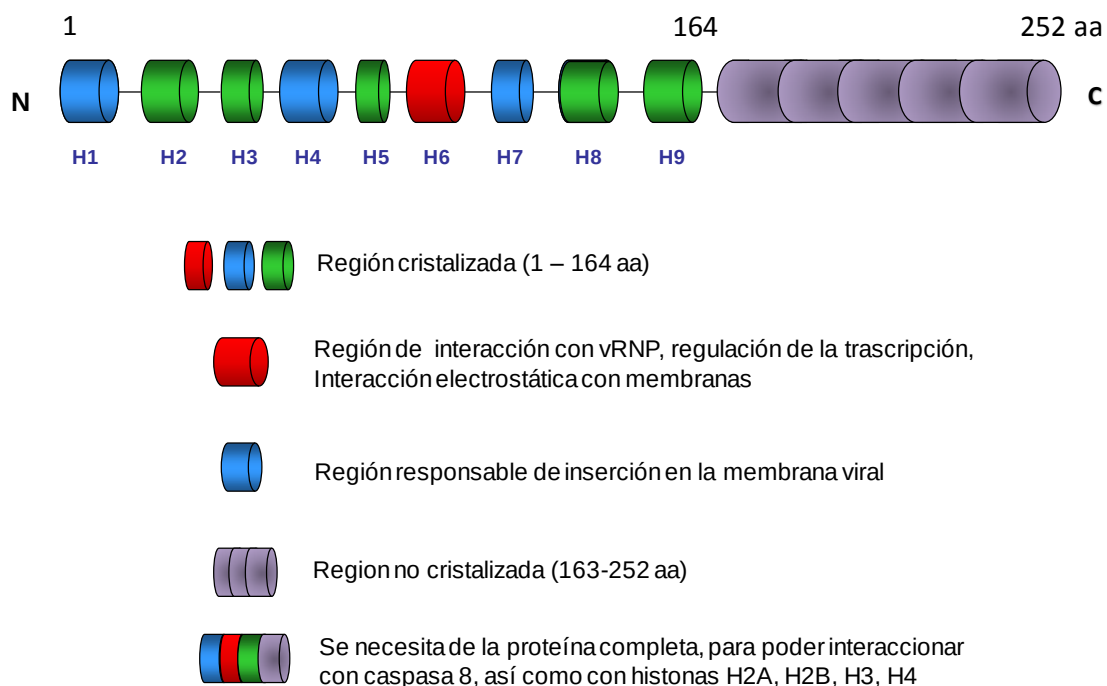


Figura I.4.1. Regiones de la proteína M1 relacionadas con una función biológica. Los cilindros de colores representan a las hélices que forman a la proteína M1.

M1 es una proteína multifuncional, y para poder desarrollar esas funciones, debe presentar una alta plasticidad conformacional. Para entender esos cambios conformacionales, así como su estabilidad, la bioquímica estructural se apoya en herramientas computacionales. Una de las estrategias utilizadas es la simulación de la dinámica molecular ya sea a bajas o altas temperaturas. En dichas simulaciones se calcula la posición, velocidad y aceleración de los átomos que componen a una proteína, de acuerdo a las ecuaciones de Newton y permiten explorar el espacio conformacional accesible (en este caso) de la proteína M1 en distintos ambientes fisicoquímicos (presión, temperatura, presencia de cosolutos, entre otros).

I.6.- Simulaciones de dinámica molecular de proteínas

El uso de las ecuaciones de Newton nos permite analizar y entender la dinámica de las proteínas dentro de un ambiente acuoso con o sin cosolutos. Además las simulaciones nos pueden proveer información detallada acerca del comportamiento individual de un átomo en función del tiempo. Por lo tanto podrían estos estudios nos permiten caracterizar las propiedades de un modelo biológico más fácilmente que experimentos realizados *in vitro* de ese mismo sistema. Está claro que los experimentos *in vitro* son muy importantes debido a que son ellos los que validan las metodologías utilizadas en la simulación.

Las simulaciones de dinámica molecular nos permiten explorar el efecto que tiene el solvente o la temperatura en las fluctuaciones que presentan cada uno de los átomos de una proteína.

Actualmente se ha utilizado la simulación por dinámica molecular en varios sistemas proteicos para entender varios procesos, tales como: análisis de los cambios conformacionales que permiten entender el mecanismo de acción de la chaperona GroEL (Ma *et al.*, 2000); dinámica de activación de tirosin cinasas (Young *et al.*, 2001); análisis de la dinámica de moléculas en un estado excitado, tal es el caso de aquellas que participan en el proceso de fotosíntesis (Gehlen *et al.*, 1994), entre muchas otras.

I.7.- Desplegamiento de proteínas evaluado por simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de proteínas a altas temperaturas por dinámica molecular se han convertido en una herramienta muy poderosa para entender cambios estructurales debidos al desplegamiento de varios sistemas de proteínas (Day *et al.*, 2003; Kundu *et al.*, 2008; Jonsson *et al.*, 2009).

Esto como bien sabemos también nos provee de información sobre los procesos de

plegamiento y desplegamiento, así como de los posibles factores que puedan afectar la estabilidad y por lo tanto la función proteica. El estudio de desplegamiento de proteínas por simulaciones, se realizan generalmente incrementando la temperatura con el propósito de superar las fuerzas entálpicas que estabilizan la estructura tridimensional de la proteína. Se ha demostrado que las simulaciones a altas temperaturas aceleran las vías de desplegamiento, fuera de afectar la propia vía de desplegamiento. Es necesario tener en cuenta que el uso de temperaturas más elevadas en los ensayos de dinámica molecular con respecto a las temperaturas utilizadas en los ensayos *in vitro* es debido a la escala accesible de tiempo que se tienen en cada tipo de ensayo, teniendo en cuenta que en simulaciones de dinámica molecular del desplegamiento, se evalúan las etapas iniciales del proceso en intervalos de tiempo de nanosegundos (Day *et al.*, 2002; Dagget *et al.*, 2002).

Actualmente no se cuenta con ningún reporte en el que se estudie la estabilidad y plasticidad conformacional, ni el mecanismo de plegamiento/desplegamiento ni con aproximaciones *in vitro* o *in silico* de la proteína M1 de ningún subtipo de virus de la influenza.

Por lo tanto, en este trabajo se propone realizar un estudio de estabilidad/plasticidad tanto *in vitro* como *in silico* de la proteína M1. Además en los estudios *in silico* se pretende analizar de manera específica la estabilidad y dinámica de aquellas estructuras de M1 que se les ha atribuido un fuerte impacto funcional, ya sea en la interacción con la membrana (H1, H4, H6 y H7) o en la participación en diversos procesos dentro del núcleo de la célula huésped (H6). Finalmente se tratara de realizar una correlación de los resultados obtenidos *in vitro* e *in silico* para poder entender la multifuncionalidad de M1.

II.- ANTECEDENTES

La influenza es una enfermedad que presenta una alta incidencia en la población humana, principalmente en temporadas de invierno.

Hasta el momento todas las estrategias de prevención o tratamiento de la influenza van dirigidos principalmente sobre las proteínas de superficie del virión: NA, HA y M2. En general estas estrategias no han sido tan exitosas por la gran cantidad de cambios antigénicos que presentan estas proteínas, lo que pone de manifiesto la necesidad de proponer nuevos blancos terapéuticos contra la influenza.

Uno de estos blancos que podría ser interesante es la proteína de matriz M1, debido a que se encuentra en mayor proporción en el virión con 1 000 a 3 000 copias (Ruigrok *et al.*, 1989) y asimismo se encuentra formando la cápside del virus. Además de ser una proteína estructural, M1 juega un papel muy importante durante el ciclo replicativo del virión ya que desempeña varias funciones dentro de la célula huésped, entre las que destacan:

- a) La inhibición de la transcripción (Watanabe K., *et al.* 1996)
- b) Favorece la traslocación del complejo de ribonucleoproteico viral (vRNP) del núcleo de la célula infectada hacia su citoplasma (Martin K. and Helenius A., 1991a; Bui M. *et al.* 2000)
- c) Interacciona con las regiones citoplásmicas de las proteínas HA y NA para favorecer la multimerización de la proteína M1 (Ali A., *et al.* 2000)
- d) Interacciona con la membrana mediante cuatro regiones propuestas: H1, H4, H6, H7 (Ruigrok R. *et al.* 2000; ShishKov A. *et al.* 1999; Sha B. y Luo M, 1997)
- e) M1 promueve el inicio de la formación de la partícula viral en la superficie de la célula hospedera (NayaK D. *et al.*, 2004)

La proteína M1 está compuesta por 252 aminoácidos y hasta el momento sólo se han podido cristalizar los primeros 164 aminoácidos de la región amino terminal. Esta

región está formada por 8 hélices- α y una hélice 3-10 (Sha B, *et al.*, 1997).

De acuerdo a esta diversidad de funciones, la proteína M1 podría ser un blanco interesante para el desarrollo de fármacos. Es posible que algún fármaco pudiera interferir con alguna de las funciones que esta desempeña, de esa manera impedir la formación de partículas virales. Sin embargo, para llegar hasta este punto, primero se tiene que conocer y entender la estabilidad conformacional que mantiene M1, bajo diferentes condiciones de estrés y de esa manera tener un panorama mucho más claro sobre la plasticidad de M1.

Actualmente no se cuenta con mucha información que nos refiera acerca de la estabilidad o plasticidad conformacional de M1, aun cuando los estudios de esta proteína datan de 1980. Lo único con lo que se cuenta, es con un estudio en el que proponen que la región amino – terminal comprendida entre los aminoácidos 1 al 164 se encuentra muy estructurada (rico en hélices- α) y adopta una forma compacta; mientras que el extremo carboxilo – terminal, que abarca los aminoácidos del 165 al 252 se encuentra poco estructurada y adoptando una conformación extendida (Arzt *et al.*, 2001).

Al respecto de la sobreexpresión de M1 recombinante, existen varios reportes en los que se presenta la obtención de M1 de manera recombinante y totalmente soluble de la proteína M1 del virus de la influenza de la cepa A/Puerto Rico/8/34 (RuigroK *et al.*, 2000, Noton *et al.*, 2007, Elster *et al.*, 1997). Se ha logrado obtener la expresión de cuatro distintas construcciones de M1 con diferentes longitudes y completamente solubles:

- a) Comprendida de los aminoácidos 1 – 162 (Harris, *et al.*, 2001)
- b) Comprendida entre los aminoácidos 1-164 (Baudin *et al.*, 2001)
- c) De los aminoácidos 165 – 252 (Baudin *et al.*, 2001)
- d) La proteína completa, siendo los 252 aminoácidos (Arzt *et al.*, 2001).

Pese a que el virus de la influenza A/H1N1/2009 tuvo un gran impacto de morbilidad y mortalidad en la población de seres humanos en la pasada pandemia del 2009, hasta

el momento no se ha encontrado ningún reporte en el que se haya expresado de manera recombinante a la proteína M1 de esta cepa. El estudio de esta proteína nos permitiría conocer si M1 tuvo participación en la patogenicidad que desarrolló el virus en los seres humanos. Por tal motivo, en este trabajo de investigación se propone expresar y purificar la proteína M1 de la cepa A/H1N1/2009 (exclusivamente de la que se presentó en aquellos virus aislados de pacientes mexicanos) con el objeto de estudiar su estabilidad estructural así como conocer cuál es el correcto plegamiento que adopta en su conformación nativa.

También se analizó la estabilidad/plasticidad conformacional mediante cálculos computacionales utilizando estrategias como las simulaciones por dinámica molecular. Hasta donde sabemos este es el primer estudio en el que se describa el espacio conformacional de M1 mediante esta aproximación.

Simultáneamente se desea conjuntar y tratar de correlacionar los resultados que se obtengan de los estudios *in vitro* con los estudios *in silico*, estrategia que nos ayudará a entender la estabilidad de M1, además de conocer y proponer de manera particular que posibles estructuras son más estables o inestables bajo ciertas condiciones de estrés (en nuestro caso se propone utilizar la temperatura como agente desestabilizante).

Es de destacar que este trabajo permitirá entender la plasticidad funcional de M1, así como sentar las bases para proponer posibles regiones blanco para el diseño de fármacos.

III.- JUSTIFICACIÓN

El virus de la influenza (genero A, B, C) es causa frecuente de infecciones respiratorias en aves, mamíferos y en especial en el ser humano. El tipo A es el de mayor importancia médica por los efectos adversos que provoca en el ser humano, los cuales van desde fiebre, congestión del tracto respiratorio alto, faringitis y lo más peligroso, un abatimiento del sistema inmune que es aprovechada por algunos patógenos para causar neumonía y como consecuencia la muerte del individuo.

El subtipo A H1N1 del virus de la influenza (de origen aviar) ha sido blanco de una gran cantidad de estudios debido a tres puntos importantes:

- El virus ha adquirido la capacidad de infectar a seres humanos y lo más grave es que ha logrado transmitirse de manera satisfactoria de humano a humano.
- Ha sido uno de los agentes causales de las más devastadoras pandemias en los años 1918 y más recientemente en el 2009, entre otras
- Las proteínas virales de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) sufren continuamente de cambios puntuales de secuencia. (drift), lo cual origina nuevas variantes del virus, que son capaces de evadir la respuesta inmune de los individuos y que favorece la aparición de epidemias de influenza en los periodos invernales, esto especialmente en países cercanos al hemisferio norte (Canadá, USA y México).

Se han diseñado fármacos análogos al ácido siálico tales como oseltamivir y zanamivir con la finalidad de inhibir la actividad de la neuraminidasa (NA). Estos fármacos se han utilizado en la práctica clínica desde 1999 y aunque han tenido resultados alentadores en el tratamiento de la influenza A y B, existen reportes de ensayos *in vitro* e *in vivo* que el uso de oseltamivir puede seleccionar las cepas de influenza A/H1N1 resistentes debido a la aparición de mutaciones puntuales que se fijan en la NA.

Además la HA también es susceptible de sufrir cambios mayores de secuencia, generando nuevos subtipos virales, estos pueden verse reflejados en una evasión de la respuesta inmune, razón por la cual año con año se tienen que elaborar vacunas, utilizando como antígeno a los virus estacionales circulantes un año anterior.

Esto representa un importante gasto para el sector salud, por tal motivo se tienen que

proponer nuevas proteínas blanco, así como nuevas estrategias para abatir la infección por influenza.

Una proteína interesante del virus de la influenza que puede cubrir los aspectos que se buscan es M1, la cual es altamente conservada y además tiene un papel multifuncional tanto en la estructura como en el ciclo replicativo del virus. Por lo tanto, sería interesante analizar la estabilidad estructural de M1 identificando regiones o residuos susceptibles a ser desestabilizados o alterados en el diseño racional de fármacos.

IV.- OBJETIVOS

IV.1.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la estabilidad estructural de la proteína M1 del virus de la influenza A H1N1/2009

IV.2- OBJETIVOS PARTICULARES

IV.2.1.- *In vitro*

- Clonar, a partir del segmento 7, el gen que codifica para la proteína M1 en un vector de expresión heteróloga
- Sobre-expresar y purificar a la proteína M1 recombinante

IV.2.2.- *In silico*

- Obtener el modelo tridimensional de la secuencia completa de M1 A H1N1/2009
- Evaluar la estabilidad/plasticidad de M1 mediante una simulación de la dinámica molecular de las etapas iniciales del desplegamiento térmico

V.- METODOLOGÍA

V.1.- *In vitro*

V.1.1.- Obtención del gen de M1 del virus de la influenza A H1N1 de la pandemia de México 2009

El segmento 7 del virus de la influenza que se presentó en la población mexicana durante el periodo pandémico del 2009 (según secuencias reportadas en la base de datos NCBI) fue obsequiada cordialmente por el Instituto J. Craig Venter (Rockville, Maryland USA). Este segmento mediante splicing alternativo genera dos proteínas: M2 y la de nuestro interés, M1. Por lo tanto, se utilizó la ingeniería genética con la finalidad de obtener únicamente el gen que codifica para M1.

Se diseñaron dos oligonucleótidos:

- Sentido 5'--- GCCAAGTCCATATGAGTCTTCTAACCG --- 3'
- Reverso 5'--- TGGCTCGAGAGCGACTTGAAT --- 3'

Estos oligonucleótidos flanquean los extremos del gen M1. Además al oligonucleótido sentido se le agregó un sitio de corte para la enzima Nde-I, mientras que al oligonucleótido reverso se le agregó un sitio de corte para la enzima Xho I y adicionalmente lleva una base diferente a la secuencia del templado (A en lugar de G), con la finalidad de incorporar un codón de paro de la traducción.

V.1.2.- Condiciones de PCR para amplificar el gen de M1

El gen M1 se amplificó mediante PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos previamente diseñados, así como el Kit de PCR de la amplificasa EA250 (los dNTPs fueron agregados por separado; Invitrogen, 674425), se prepararon 20 µl de la mezcla de reacción de acuerdo a lo especificado por el proveedor. La reacción fue llevada a cabo en un termociclador eppendorf (22331), mediante las siguientes condiciones:

Proceso	Condición
1.- Desnaturalización inicial de las cadenas	94 °C por 5 minutos
2.- Desnaturalización de cadenas	94 °C por 1 minuto
3.- Hibridación de oligonucleótidos	50 °C por 1 minuto
4.- Elongación de cadenas	72 °C por 1 minuto
5.- Elongación final de cadenas	72 °C por 5 minutos

Es interesante recalcar que se realizaron 35 ciclos de la reacción de PCR, repitiéndose de manera continua los pasos del 2 al 4, del programa de PCR mencionado con anticipación.

V.1.3.- Purificación del amplificado (gen M1) obtenido por PCR

Después de la amplificación del gen M1, el producto de PCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (ONBIO, AG-100); se utilizó una cámara de electroforesis MiniRun GE-100 (Hangzhou Bioer Technology CO, BYQ6043U-355) las condiciones de electroforesis fueron las siguientes: se utilizó el amortiguador TE 1X, el voltaje utilizado para la migración de las muestras fue de 100 volts, por un tiempo aproximado de 40 minutos.

Posteriormente el gel fue teñido 10 minutos con una solución de bromuro de etidio al 0.1 % (USBiological, E8500). La banda correspondiente al gen de M1 finalmente se purificó del gel de agarosa mediante el Kit QIAquick Gel Extraction.

V.1.4.- Clonación del gen M1 en el vector pJET1.2

El gen de M1 purificado fue subclonado en el vector pJET1.2 (# de catálogo: K1231, de la casa comercial fermentas), bajo las siguientes condiciones de ligación:

Solución	Volumen (μl)
- Amortiguador 10X	2
- T4 DNA ligasa	1
- Vector pJET1.2	2
- Inserto (gen M1)	6
- Agua libre de DNAsas	9
Volumen Total	20 μl

La reacción de ligación se incubó 1 hora a 22 °C y posteriormente 14 horas a 4 °C. Finalmente se tomaron 10 µl de la reacción de ligación para transformar células ultracompetentes de *E. coli* DH5-α.

V.1.5.- Transformación de células *E. coli* DH5- α

Se descongeló en hielo, un vial (con 100 µl) de células ultracompetentes (mediante la técnica de cloruro de rubidio). Una vez descongeladas se les agregaron 10 µl de la reacción de ligación (pJET1.2-M1 o en su defecto pET19b-M1) y se dejó incubar la muestra 30 minutos en hielo. Posteriormente a las células ultracompetentes se les dio un choque térmico de 42 °C por 90 segundos, después las células fueron estabilizadas 2 minutos en hielo, a continuación se les agregaron 900 µl de medio 2XYT. Enseguida se incubaron a 37 °C, 230 RPM por una hora y finalmente se plaquearon en agar LB – Ampicilina 100 µl de las transformantes, la placas fueron incubadas a 37 °C hasta poder identificar colonias transformantes sobre el agar.

V.1.6.- Minipreps de células DH5 – α-pJET1.2 / pET19b-M1

Para identificar cuáles de las colonias obtenidas en la placa eran positivas para el gen M1, se realizaron minipreps mediante lisis alcalina (Sambrook *et al.* 2001). Por otro lado, para purificar el vector (libre de contaminantes y/o sales) de aquellas colonias que fueron positivas para el gen M1, se utilizó el Kit **QIAprep Spin Miniprep** de la casa comercial QIAGEN (con numero de catálogo 27106).

V.1.7.- Transformación de células competentes de expresión de *E. coli* de la cepa BL21 DE3pLyS y Rosetta gami

Se siguió el mismo procedimiento que el utilizado en la transformación de la cepa de *E. coli* DH5-α (ver número IV). Con la excepción de que aquí se utilizó 1µl del vector pET19b – M1 y no una muestra de ligación.

V.1.8.- Ensayos de sobre-expresión de la proteína M1

Se realizaron ensayos de sobre-expresión de la proteína M1, en ambas cepas de *E. coli* (BL21 DE3pLyS y Rosetta gami) que fueron positivas para el gen M1. Se puso un precultivo: donde se inocularon 5 ml de medio de cultivo LB con una colonia, el medio fue adicionado con el respectivo antibiótico de selección; se dejó incubar a 37 °C, 200 RPM por 14 horas (incubadora mrc, 9605310113C). Posteriormente se inoculó un cultivo masivo de 500 ml de medio de cultivo LB (adicionado con el respectivo antibiótico de selección) con el precultivo previamente mencionado en una

proporción de 1:10. A continuación se incubó el cultivo a 37 °C, 200 RPM (incubadora mrc, 9605310113C). y cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.6 a 600 nm, se le agregó IPTG (1 mM) (SIGMA, con numero de catálogo: I6758-1G) al cultivo, para iniciar la expresión de la proteína M1 por un tiempo límite de 4 horas. Se recuperaron las bacterias por centrifugación a 5 000 RPM por 20 minutos (centrifuga eppendorf, 5804R). Las bacterias recuperadas se congelaron a -70 °C (ultracongelador, de la casa comercial SANYO, modelo: MDF-U73VC), para un uso posterior.

V.1.9.- Purificación de la proteína M1

Un vial proveniente de 100 ml de células inducidas (del apartado VI) se descongeló a temperatura ambiente. El pellet de células se resuspendió en 10 ml del amortiguador de lisis y se le adicionaron 10 mg de lisozima, a continuación se dejó incubar la muestra 15 minutos a temperatura ambiente, y en agitación. Después se sonicó (Sonics and Materials INC, modelo CV188) la muestra por 100 segundos en lapsos de 10 y 20 segundos de reposo entre pulso y pulso. Posteriormente se centrifugó la muestra a 10 000 RPM por 20 minutos (centrifuga eppendorf, 5804R). Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue procesada para purificar los cuerpos de inclusión (parte insoluble donde se encuentra la proteína M1).

V.1.10.- Purificación de cuerpos de inclusión

La pastilla de la lisis celular, se resuspendió en 10 ml del amortiguador de resuspensión, después se sonicó (Sonics and Materials INC, modelo CV188) el resuspendió por 60 segundos en lapsos de 10 segundos y 20 segundos de reposo entre pulso y pulso (nota: la sonicación de la muestra siempre se realizó en frío, para evitar la degradación de la proteína M1 recombinante). Posteriormente se incubó 20 minutos la muestra en agitación (Rocker 25) y a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se centrifugó la muestra a 13 000 RPM por 30 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió nuevamente en 10 ml del amortiguador de resuspensión. Después se incubó la muestra a temperatura ambiente por 20 minutos y en agitación. Nuevamente se centrifugó la muestra a 13 000 RPM por 30 minutos a 4°C (centrifuga eppendorf, 5804R). Posteriormente se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 10 ml de agua desionizada, hasta obtener un aspecto homogéneo. A continuación se incubó la muestra a temperatura ambiente por 20 minutos y en agitación. De nuevo se centrifugó la muestra a 13 000 RPM por 30 minutos a 4°C (centrifuga eppendorf, 5804R). Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en una solución de 4 M de Urea, se incubó por 4 horas en agitación,

a temperatura ambiente. Nuevamente se centrifugó la muestra a 13 000 RPM por 30 minutos a 4°C (centrifuga eppendorf, 5804R). Se recuperó el sobrenadante.

V.1.11.- Purificación de la proteína M1 solubilizada en 4 M de urea

Los 10 ml de la proteína M1 solubilizada en 4 M de urea, fueron incubados con 1ml de resina NiNTA (QIAGEN, numero de catálogo 30210) previamente equilibrada con el amortiguador de lavado. La proteína – resina fueron mantenidos a temperatura ambiente y en leve agitación en por un tiempo de una hora. A continuación la resina fue lavada con 100 ml del amortiguador de lavado. Después se eluyó la proteína M1 de la resina con 50 ml del amortiguador de elución, adicionado con 250 mM de imidazol. Las fracciones eluidas fueron visualizadas en un gel de acrilamida.

V.2.- In silico

V.2.1.- Selección del Gen M1 y posteriormente la proteína M1 del virus de la influenza A/H1N1/2009 exclusiva de México

Del banco de genes de pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/>) se obtuvieron todas las secuencias completas de los genes de M1 que fueron reportadas para virus aislados de pacientes mexicanos. Se reportaron 102 secuencias completas las cuales constan de 756 nucleótidos. Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple entre ellas y se obtuvo una secuencia consenso.

La secuencia consenso del gen M1 fue traducida a aminoácidos con apoyo del algoritmo online translate del servidor de Expasy (<http://expasy.org/tools/dna.html>). Posteriormente la secuencia de aminoácidos sirvió como templatado para modelar la proteína M1. El modelo tridimensional de la proteína M1 fue realizado con el modelador automático I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Este servidor dio como resultado cinco modelos hipotéticos; la selección del modelo viable, se realizó en base a los parámetros: RMSD, Tm-score y C-score

V.2.2.- Validación del modelo tridimensional de M1

El modelo tridimensional previamente descrito fue validado mediante un gráfico de Ramachandran (este permitió determinar si los enlaces y los ángulos diedros θ y ϕ están dentro de las áreas permitidas, para las estructuras secundarias que forman a la proteína M1) el cual fue obtenido en el servidor en línea **MolProbity** (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>).

V.2.3.- Simulación por dinámica molecular del modelo 3D de M1

Después de la validación del modelo se continuó con los preparativos del sistema, para iniciar la simulación. Para realizar la dinámica molecular, se utilizó el software gromacs y las condiciones utilizadas para correr la simulación fueron las siguientes:

- 1- Se construyó una caja cubica de 1 nm por lado, con un volumen de 122 .66 nm³; la proteína fue colocada en el centro de la caja.
- 2- Se solvató la caja con 14 496 moléculas de agua.
- 3- Como el sistema no estaba en equilibrio debido a que tenía una carga de

+7, por lo tanto se tuvieron que agregar 7 átomos de cloro.

- 4- Se agregaron 100 mM de NaCl al sistema (para alcanzar esta concentración se tiene que seguir la siguiente relación: 21 átomos ^+Na / ^-Cl para un sistema con 6 500 moléculas de agua y debido a que nuestro sistema cuenta con 14 496 moléculas de agua, entonces, haciendo la relación tuvimos que agregar 47 átomos de cloro y 47 átomos de sodio).
- 5- Para relajar las tensiones dentro del modelo tridimensional de M1 la proteína, se realizaron varios pasos de minimización de energía y de dinámica molecular. Se utilizó la energía potencial para minimizar la energía del sistema, la cual convergió a los 300 pasos en el átomo 2 235 con una fuerza máxima de 1.81025×10^3 .

Finalmente la proteína M1 fue simulada 20 000 ps a una concentración de 100 mM de NaCl. La simulación fue realizada en condiciones nPT (número de moléculas, presión y temperatura constantes), utilizando el termostato Nose-Hoover, el baróstato Parrinello-Rahman y el campo de fuerzas OPLS-AA/L. Se realizaron simulaciones a tres diferentes temperaturas: 300 K (26.83 °C), 400 K (126.83 °C) y 500 K (226 °C).

V.2.4.- Análisis de los datos de la simulación por dinámica molecular

Se utilizó el software VMD para analizar la trayectoria de los átomos a lo largo de los 20 000 ps de la simulación. También fue utilizado este mismo software para animar la estructura de la proteína M1.

Los parámetros como: RMSD, RMSF, radio de giro, SASA (área de exposición al solvente), cambios de las estructuras secundarias y número de puentes de hidrógeno, se utilizaron para evaluar los cambios que sufrió la proteína M1 a lo largo de la simulación. Los parámetros previos fueron calculados con el software gromacs.

Mientras que los puentes salinos fueron calculados con el software online ESBRI (<http://bioinformatica.isa.cnr.it/ESBRI/introduction.html>).

VI.- RESULTADOS

VI.1.- *In vitro*

VI.1.1.- Caracterización del gen M1

El segmento 7 del virus de la influenza codifica, mediante splicing alternativo dos proteínas denominadas M1 y M2. El segmento 7 se encuentra clonado en el vector pLIC-HALO el cual fue amablemente donado por el Instituto J. Craig Venter (Maryland Estados Unidos). Debido a la escasa información con la que se contaba acerca del vector (sitios de corte, sitios reguladores, genes asociados, así como su localización dentro del vector) y lo único que se sabía era que expresión del segmento 7 se encontraba bajo el control del promotor T7 de la ARN polimerasa y que el vector tenía el gen que le confería resistencia a ampicilina, se envió a secuenciar (utilizando oligonucleótidos universales del promotor T7) a la unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

La estrategia anterior nos permitió conocer parte (aproximadamente 700 pb) de la secuencia del segmento 7 y debido a que los resultados obtenidos nos arrojaron un gen M1 incompleto (debido a que el gen M1 consta de 756 pb y se encuentra localizado en la región 5' del segmento 7). Se diseñó ex profeso el oligonucleótido M601 – forward (5'—CCACTAATCAGGCATGAAA—3') con la propósito de conocer la secuencia completa del gen M1. Finalmente el resultado se comparó con la secuencia de referencia del segmento 7 del virus de la influenza A/H1N1/New York_1682/2009 (GenBank: GQ332646.1). Ambas secuencias tienen una identidad del 99.86 % (figura VI.1.1). No se llega a un 100 % de similitud debido a un cambio de base C por G que tiene la secuencia clonada en el vector pLIC-HALO con respecto a la de referencia. Este cambio de base no modifica la secuencia de aminoácidos de la proteína, por lo tanto, es igual a la de referencia.

	
	5 15 25 35 45 55
Segmento 7	ATGAGTCTTC TAACCGAGGT CGAAACGTAC GTTCTTTCTA TCATCCCGTC AGGCCCCCTC
Sec.	ATGAGTCTTC TAACCGAGGT CGAAACGTAC GTTCTTTCTA TCATCCCGTC AGGCCCCCTC
Comparación	*****
	
	65 75 85 95 105 115
Segmento 7	AAAGCCGAGA TCGCGCAGAG ACTGGAAAGT GTCTTTGCAG GAAAGAACAC AGATCTTGAG
Sec.	AAAGCCGAGA TCGCGCAGAG ACTGGAAAGT GTCTTTGCAG GAAAGAACAC AGATCTTGAG
Comparación	*****
	
	125 135 145 155 165 175
Segmento 7	GCTCTCATGG AATGGCTAAA GACAAGACCA ATCTTGTCAC CTCTGACTAA GGGAAATTTTA
Sec.	GCTCTCATGG AATGGCTAAA GACAAGACCA ATCTTGTCAC CTCTGACTAA GGGAAATTTTA
Comparación	*****

						
	185	195	205	215	225	235
Segmento 7	GGATTTGTGT	TCACGCTCAC	CGTGCCCACT	GAGCGAGGAC	TGCAGCGTAG	ACGCTTTGTC
Sec.	GGATTTGTGT	TCACGCTCAC	CGTGCCCACT	GAGCGAGGAC	TGCAGCGTAG	ACGCTTTGTC
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	245	255	265	275	285	295
Segmento 7	CAAAATGCCC	TAAATGGGAA	TGGGGACCCG	AACAACATGG	ATAGAGCAGT	TAAACTATAC
Sec.	CAAAATGCCC	TAAATGGGAA	TGGGGACCCG	AACAACATGG	ATAGAGCAGT	TAAACTATAC
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	305	315	325	335	345	355
Segmento 7	AAGAAGCTCA	AAAGAGAAAT	AACGTTCCAT	GGGGCCAAGG	AGGTGTCACT	AAGCTATTCA
Sec.	AAGAAGCTCA	AAAGAGAAAT	AACGTTCCAT	GGGGCCAAGG	AGGTGTCACT	AAGCTATTCA
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	365	375	385	395	405	415
Segmento 7	ACTGGTGCAC	TTGCCAGTTG	CATGGGCCTC	ATATACAACA	GGATGGGAAC	AGTGACCACA
Sec.	ACTGGTGCAC	TTGCCAGTTG	CATGGGCCTC	ATATACAACA	GGATGGGAAC	AGTGACCACA
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	425	435	445	455	465	475
Segmento 7	GAAGCTGCTT	TTGGTCTAGT	GTGTGCCACT	TGTGAACAGA	TTGCTGATTC	ACAGCATCGG
Sec.	GAAGCTGCTT	TTGGTCTAGT	GTGTGCCACT	TGTGAACAGA	TTGCTGATTC	ACAGCATCGG
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	485	495	505	515	525	535
Segmento 7	TCTCACAGAC	AGATGGCTAC	TACCACCAAT	<u>CCACTAATCA</u>	<u>GGCATGAAAA</u>	CAGAATGGTG
Sec.	TCTCACAGAC	AGATGGCTAC	TACCACCAAT	<u>CCACTAATCA</u>	<u>GGCATGAAAA</u>	CAGAATGGTG
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	545	555	565	575	585	595
Segmento 7	CTGGCTAGCA	CTACGGCAAA	GGCTATGGAA	CAGATGGCTG	GATCGAGTGA	ACAGGCAGCG
Sec.	CTGGCTAGCA	CTACGGCAAA	GGCTATGGAA	CAGATGGCTG	GATCGAGTGA	ACAGGCAGCG
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	605	615	625	635	645	655
Segmento 7	GAGGCCATGG	AGGTTGCTAA	TCAGACTAGG	CAGATGGTAC	ATGCAATGAG	AACTATTGGG
Sec.	GAGGCCATGG	AGGTTGCTAA	TCAGACTAGG	CAGATGGTAC	ATGCAATGAG	AACTATTGGG
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	665	675	685	695	705	715
Segmento 7	ACTCATCCTA	GCTCCAGTGC	TGGTCTGAAA	GATGACCTTC	TTGAAAATTT	GCAGGCCTAC
Sec.	ACTCATCCTA	GCTCCAGTGC	TGGTCTGAAA	GATGACCTTC	TTGAAAATTT	GCAGGCCTAC
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	725	735	745	755		
Segmento 7	CAGAAGCGAA	TGGGAGTGCA	GATGCAGCGA	TTCAAC		
Sec.	CAGAAGCGAA	TGGGAGTGCA	GATGCAGCGA	TTCAAG		
Comparación	*****	*****	*****	*****		

Figura VI.1.1. Análisis del fragmento clonado en el vector pLIC-HALO. En la primera línea se muestra el segmento 7 de referencia (GQ332646.1); en la segunda línea se muestra el segmento (Sec.) a comparar (clonado en el vector pLIC-HALO) y finalmente en la tercera línea se muestra en asteriscos de color azul la similitud que muestran ambas secuencias. La secuencia subrayada muestra la región que sirvió como templado para diseñado el primer M1-601-forward.

El vector pLIC-HALO, en el que estaba clonado originalmente el gen M1, no es un vector de expresión debido a la ausencia de un promotor inducible. Por lo tanto, para la sobreexpresión del gen M1 del virus de la influenza A/H1N1 en *E coli* fue necesario subclonar el gen M1 en un vector de expresión, siendo el pET19b modificado (pET19b-m) el seleccionado. Para dicho propósito fue necesario diseñar un par de oligonucleótidos (sentido: SNdeM1 y antisentido RXhoM1) los cuales tienen las siguientes características:

- a) El oligonucleótido SNdeM1 tiene un sitio de corte para la endonucleasa Nde I y es complementario con el extremo 5' del gen M1
- b) El oligonucleótido RXhoM1 tiene un sitio de corte para la endonucleasa Xho I y es complementario al extremo 3' del gen M1, al mismo tiempo este oligonucleótido tiene un cambio de tres bases que permite agregar un codón de paro de la traducción para la proteína M1 en el sitio correcto; de acuerdo a lo reportado en el GenBank para la proteína M1 del virus de la influenza A/H1N1/New York/1682/2009 (con numero de acceso 242346842), la cual corresponde a la cepa pandémica que fue hallada en México en el 2009 (A/H1N1/2009/México).

VI.1.2.- Amplificación y purificación del gen M1

En la figura VI.1.2 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos SNdeM1 y RXhoM1 utilizados para amplificar el gen de M1, mediante la técnica de PCR.

a) Sentido: SNdeM1 5' --- GTGAAGTCC**CATATG**AGTCTTCTAACCG ---- 3'

b) Reverse: RXhoM1 5' --- ATAG**CTCGAG**TC**ATT**ACTTGAATCGCT ---- 3'

Figura VI.1.2. Oligonucleótidos para poder amplificar y subclonar el gen M1. En el inciso a) se muestra el oligonucleótido que flanquea el extremo 5' del gen M1; los nucleótidos resaltados en negritas y subrayados representan el sitio palindrómico para el corte de la enzima Nde I y los tres últimos nucleótidos (ATG) representan el codón de inicio de la traducción. En inciso b) se muestra el oligonucleótido que flanquea el extremo 3' del gen M1; los nucleótidos representados en negritas y subrayados representan el sitio palindrómico para el corte de la enzima Xho I, mientras que los nucleótidos subrayados con doble línea simbolizan al codón de paro de la traducción de la proteína M1.

A continuación se amplificó el gen de M1 (con los respectivos oligonucleótidos en sus extremos 5 y 3') mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el resultado fue visualizado en un gel de agarosa, donde se observó una banda de 783

pares de bases. Esta banda se encontraba dentro del peso esperado debido a que el gen de M1 tiene 756 pb más 11 pares extras que tiene el oligonucleótido SNdeM1, mas 16 bases extras que tiene el oligonucleótido RXhoM1 dan un total de los 783 pb, (ver figura VI.1.3).

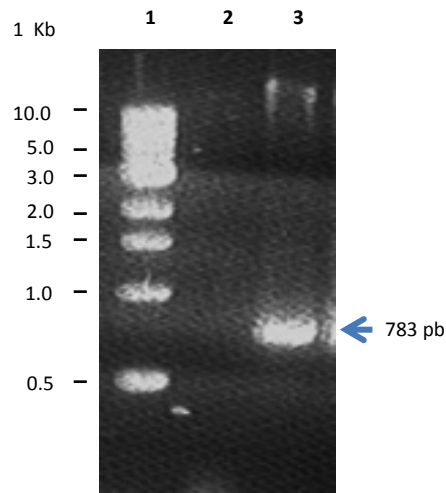


Figura VI.1.3. Amplificación del gen M1. En el carril 1 se localiza el marcador de tamaño molecular del fago λ de 1 Kb (New England Biolabs); en el carril 2 se encuentra el control negativo (vector pDON221, con el gen de HA) y finalmente en el carril 3 se muestra la reacción de PCR del vector pLIC-HALO, donde se observa un amplificado de aproximadamente 783 pb (correspondiente al gen M1, más bases extras de los oligonucleótidos), señalado con la punta de flecha de color azul. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio

Posteriormente, el gen M1 amplificado fue cortado y purificado del gel de agarosa y se verificó su pureza (libre de oligonucleótidos, dNTPs y templado) en un gel de agarosa al 1 %, ver figura VI.1.4.

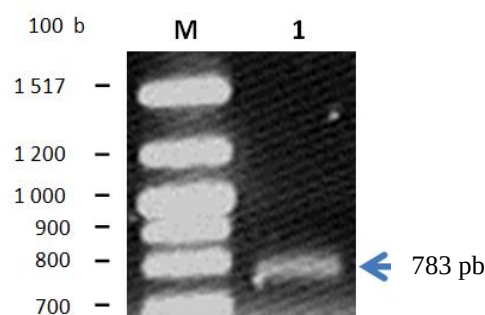


Figura VI.1.4. Purificación del gen M1 (amplificado a partir de una reacción de PCR). El carril M corresponde al marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases (New England Biolabs). En el carril 1 se observa que el gen M1 (señalado con una punta de flecha color azul) está libre de contaminantes, después de haber sido purificado de un gel de agarosa al 1 %. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

VI.1.3.- Subclonación del gen M1 en el vector pJET1.2

A continuación se ligó el gen M1 (previamente purificado del gel) en el vector de clonación pJET1.2 (2 974 pb). Se tomó una fracción de la reacción de ligación y se transformaron células ultra-competentes de *E. coli* DH5 – α , obteniéndose 42 clonas, a las cuales se les realizaron miniprep por lisis alcalina y los vectores resultantes fueron mantenidos en refrigeración para análisis posteriores.

Se eligieron de manera aleatoria 3 clonas (10, 12 y 23) de las 42 obtenidas, para analizarlas mediante una PCR confirmatoria, utilizando los oligonucleótidos específicos para el gen M1 (SNdeM1 y RXhoM1). Analizando el producto de la reacción de PCR, se encontró que las tres clonas (10, 12 y 23) seleccionadas fueron positivas para el gen M1, tal como se observa en la figura VI.1.5.

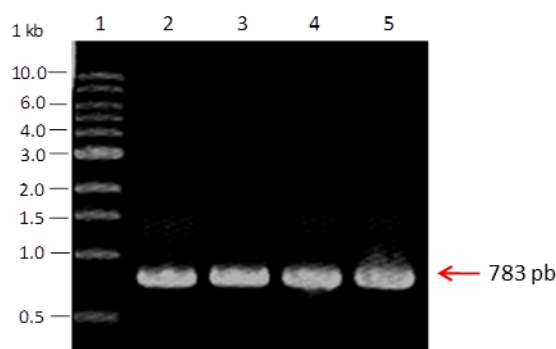


Figura VI.1.5. PCR confirmatoria de las clonas 10, 12 y 23. El carril 1 corresponde a al marcador de tamaño molecular (New England Biolabs). El carril 2 corresponde al control positivo (vector pLIC-HALO, el cual tiene clonado el gen de M1). El carril 3 corresponde a la clona 10; el carril 4 corresponde a la clona 12; el carril 5 corresponde a la clona 23. La flecha de color rojo señala la región donde se esperaba ubicar el amplificado de 783 pb. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Una vez que se determinó por PCR que las tres clonas: 10, 12 y 23 eran positivas para el gen M1; entonces se decidió liberar el inserto de las tres. clonas previamente mencionadas con dos enzimas de restricción Xho I y Xba I, las cuales cortan en los extremos del sitio de clonación del vector pJET1.2 (Xho I corta en el extremo 5' y Xba I, corta en el extremo 3'). Con este ensayo pudimos descartar a las clonas 10 y 12, ya que liberaron un fragmento cercano a las 900 pb, (ver carril 3 y 5 de la figura VI.1.6) y el vector linearizado únicamente con la enzima Xho I dio un fragmento con un tamaño mayor a 5 000 pb (ver carriles 2 y 4 de la figura VI.1.6), lo cual no es correcto debido a que se espera que se encuentre en un peso cercano a 3 757 pb (2 974 del vector y 783 pb del gen M1).

Realizando los mismos ensayos pudimos constatar que la clona 23 era la única que realmente era positiva debido a que cuando se linearizaba el vector con la enzima Xho I, se generaba una banda del tamaño esperado de 3 757 pb (2 974 del vector y 783 pb del gen M1) y además se liberaba un fragmento con el tamaño del gen M1 (ver carril 6 de la figura VI.1.6). Este efecto podría explicarse por la existencia de dos sitios de corte para la enzima Xho I: uno proporcionado por el vector en el extremo 5' del sitio de clonación y otro proporcionado por el inserto en su extremo 3'.

El fragmento liberado de la clona 23 con las enzimas Xho I y Xba I correlaciona con el obtenido con la linearización del vector con la enzima Xho I (ver carriles 6 y 7 de la figura VI.1.6). De estos resultados podríamos concluir que la clona 23 es la única que tiene debidamente clonado el gen M1 como copia única. Por lo tanto se eligió a la clona 23 para continuar los ensayos de subclonación del gen M1 al vector pET19b-m.

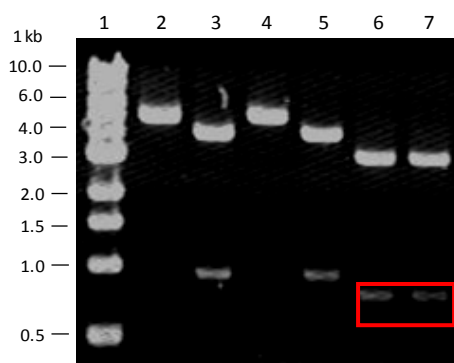


Figura VI.1.6. Liberación del inserto de los vectores de las clonas 10, 12 y 23. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular 1 kb (New England Biolabs). Los carriles 2 y 3 corresponden al vector de la clona 10 digerido con Xho I y con Xho I – Xba I respectivamente. Los carriles 4 y 5 corresponden al vector de la clona 12 digerido con la endonucleasa Xho I y con Xho I – Xba I respectivamente. Finalmente los carriles 6 y 7 corresponden al vector de la clona 23 digerido con Xho I y con Xho I – Xba I respectivamente. En el recuadro de color rojo se resaltan los fragmentos esperados de 776 pb, únicamente de la clona 23. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Para comprobar que el plásmido pJET1.2 extraído de la clona 23 contenía al gen que codifica para la proteína M1 en una orientación correcta, se realizó un análisis con las enzimas de restricción Nde I y Xho I. Se observó la liberación del inserto del tamaño esperado de 765 pb (756 del gen M1 y 9 bases extras del extremo 3' del gen M1 al sitio de corte de la enzima Xho I) (ver figura VI.1.7).

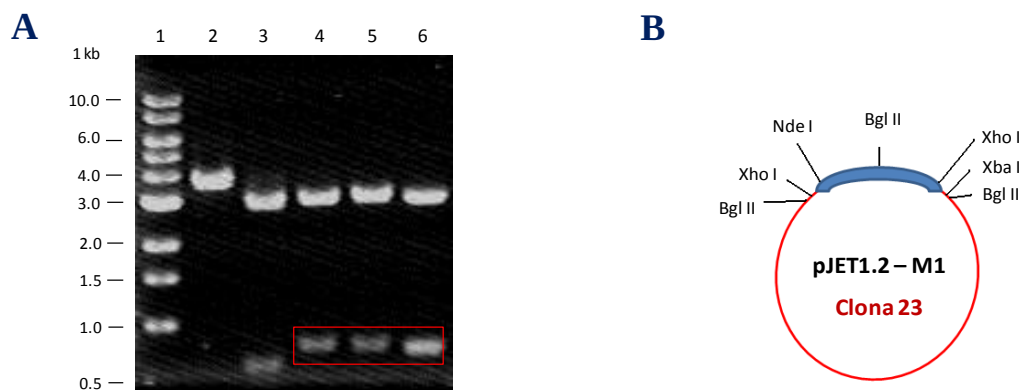


Figura VI.1.7. Análisis de los sitios de restricción del plásmido pJET1.2 extraído de la clona 23. **A.** Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular 1 kb (New England Biolabs); El carril 2 corresponde a la linearización de vector con la enzima Xba I; el carril 3 corresponde a la digestión del vector con la enzima Bgl II; el carril 4 corresponde a la liberación del gen M1 con la enzima Xho I; el carril 5 corresponde a la liberación del inserto con las enzimas Nde I/Xho I; finalmente en el carril 6 se prueban los adaptadores para las enzimas Nde I y Xho I, observándose la liberación de un fragmento que se encuentra dentro del esperado y que correlaciona con los carriles 5 y 6 resaltados en el recuadro rojo. **B.** Se muestra un esquema representativo del vector de la clona 23; el gen M1 se encuentra representado por un cuarto de círculo de color azul, mientras que el vector pJET1.2 es representado como el resto del círculo de color rojo; los sitios de corte específicos para las enzimas de restricción tanto del gen M1 como del vector, son representadas como líneas de color negro.

Posteriormente, el plásmido extraído de la clona 23 se mandó a secuenciar utilizando dos oligonucleótidos específicos del vector pJET1.2 (sentido: 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3' y reverso: 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') los cuales flanquean el sitio de multiclonación. Realizando una comparación entre los resultados obtenidos y el segmento 7 del virus de la influenza A/H1N1/New York_1682/2009, correspondiente al reportado para la población mexicana A/H1N1/2009/México (figura VI.1.8), encontramos que la secuencia del gen M1 clonado en el pJET1.2 coincide con la secuencia reportada. No se obtuvo la secuencia completa del gen M1 al 100 %, esto debido a la baja resolución de las reacciones de secuenciación dándonos como producto no más de 300 nucleótidos. En la figura VI.1.8, se resaltan con guiones de color rojo las ausencias de bases, en esta misma figura se resalta la posición del codón de paro de la traducción introducido durante la clonación.

33

						
	725	735	745	755	765	775
Segmento 7	AGATGACCTT	CTTGAAAATT	TGCAGGCCTA	CCAGAAGCGA	ATGGGAGTGC	AGATGCAGCG
Clona 23	AGATGACCTT	CTTGAAAATT	TGCAGGCCTA	CCAGAAGCGA	ATGGGAGTGC	AGATGCAGCG
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****

			
	785	795	805
Segmento 7	ATTCAACAGT	-----	-----
Clona 23	ATTCAAGTAA	GTCGCTCTCG	AGCCAAT
Comparación	*****-		

Figura VI.1.8. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del gen M1 clonado en el vector pJET1.2, con el segmento 7 del virus de la influenza A/H1N1/New York_1682/2009. Los guiones de color rojo representan las bases que no pudieron ser secuenciadas del gen M1, por la baja sensibilidad de la reacción. Las tres bases ATG subrayadas representan al sitio de inicio de la traducción, mientras que las tres bases TAA subrayadas en doble raya del extremo 3' del gen clonado en la clona 23, representan el codón de paro a la traducción, previamente agregado.

Después de haber determinado que el gen M1 se encuentra clonado en la orientación correcta en el vector pJET1.2 de la clona 23, se prosiguió a la subclonación del gen M1 al vector de expresión pET19b-m.

VI.1.4.- Subclonación del gen M1 en el vector pET19b-m

Se digirieron los vectores pJET1.2-M1 y pET19b-m con las enzimas Nde I y Xho I, esto con la finalidad de liberar el gen M1 (con extremos: 5' Nde I y 3' Xho I) y por otro lado, abrir el vector de destino pET19b-m. La reacción de digestión fue visualizada en un gel de agarosa al 1% y las bandas correspondientes al gen M1 y al vector pET19b-m (cortados con las enzimas Nde I y Xho I) fueron cortadas y purificadas del gel. Posteriormente los productos de esa purificación fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1%, con la intención de verificar que los purificados se encuentren dentro del peso esperado (pET19b-m abierto con un peso aproximado de 5 200 pb y el gen M1 digerido en sus extremos con un peso aproximado de 758 pb).

A continuación se realizó la ligación de los purificados: gen M1 (con extremos 5' Nde I y 3' Xho I) con el vector pET19b-m previamente abierto (con las enzimas Nde I y Xho I). Posteriormente el producto de la ligación se transformó en células de *E. coli* DH5- α , obteniéndose 32 clonas y seleccionándose de manera aleatoria dos de ellas para aislar el vector que cada una de ellas contenía. Enseguida se analizaron por ensayos de digestión con las enzimas de restricción Nde I y Xho I con el propósito de liberar el gen M1. Los vectores de ambas clonas revelaron la liberación de un fragmento de aproximadamente 765 pb (756 del gen M1 y 9 bases extras que están del final del gen

M1 al sitio de corte de la enzima Xho I) (carriles 3 y 5 de la figura VI.1.9), por lo tanto pudimos inferir que estas clonas son positivas para el gen M1.

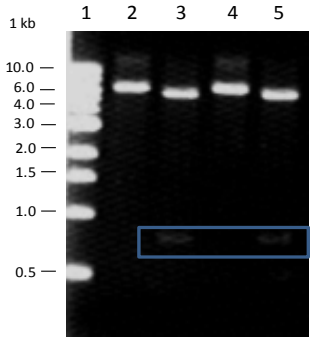


Figura VI.1.9. Clonación del gen M1 en el vector pET19b. Liberación del gen M1 del vector pET19b-M1 perteneciente a las clonas 1 y 2. Carril 1, marcador de tamaño molecular 1kb (New England Biolabs). Los carriles 2 y 4 corresponden a la linearización del vector con la enzima Xho I; carriles 3 y 5 corresponde a la liberación del gen M1 con las enzimas Nde I y Xho I). En el recuadro de color azul se resaltan los fragmentos que pertenecen al gen M1. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Posteriormente se secuenció el fragmento clonado en el vector pET19b-M1 de la clona 1 y fue comparada con el segmento 7 (únicamente el que corresponde al gen M1) del virus de la influenza A/H1N1/New York_1682/2009. Se encontró que hay un 99 % de similitud entre ellas, siendo la única diferencia el codón de paro de la traducción (TAA) previamente agregado al gen M1 (ver figura VI.1.10).

	5	15	25	35	45	55
Segmento 7	TTCCGGATGG	CTCGAGTTTT	TCAGCAAGAT	GCCAAGTCCA	-ATGAGTCTT	CTAACCGAGG
pET19b-M1					TATGAGTCTT	CTAACCGAGG
Comparación					*****	*****
	65	75	85	95	105	115
Segmento 7	TCGAAACGTA	CGTTCTTTCT	ATCATCCCGT	CAGGCCCCCT	CAAAGCCGAG	ATCGCGCAGA
pET19b-M1	TCGAAACGTA	CGTTCTTTCT	ATCATCCCGT	CAGGCCCCCT	CAAAGCCGAG	ATCGCGCAGA
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	125	135	145	155	165	175
Segmento 7	GACTGGAAAG	TGTCTTTGCA	GGAAAGAACA	CAGATCTTGA	GGCTCTCATG	GAATGGCTAA
pET19b-M1	GACTGGAAAG	TGTCTTTGCA	GGAAAGAACA	CAGATCTTGA	GGCTCTCATG	GAATGGCTAA
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	185	195	205	215	225	235
Segmento 7	AGACAAGACC	AATCTTGTC	CCTCTGACTA	AGGGAATTTT	AGGATTTGTG	TTACACGCTCA
pET19b-M1	AGACAAGACC	AATCTTGTC	CCTCTGACTA	AGGGAATTTT	AGGATTTGTG	TTACACGCTCA
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	245	255	265	275	285	295
Segmento 7	CCGTGCCAG	TGAGCGAGGA	CTGCAGCGTA	GACGCTTTGT	CCAAAATGCC	CTAAATGGGA
pET19b-M1	CCGTGCCAG	TGAGCGAGGA	CTGCAGCGTA	GACGCTTTGT	CCAAAATGCC	CTAAATGGGA
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****

						
	305	315	325	335	345	355
Segmento 7	ATGGGGACCC	GAACAACATG	GATAGAGCAG	TTAAACTATA	CAAGAAGCTC	AAAAGAGAAA
pET19b-M1	ATGGGGACCC	GAACAACATG	GATAGAGCAG	TTAAACTATA	CAAGAAGCTC	AAAAGAGAAA
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	365	375	385	395	405	415
Segmento 7	TAACGTTCCT	TGGGGCCAAG	GAGGTGTCAC	TAAGCTATTC	AACTGGTGCA	CTTGCCAGTT
pET19b-M1	TAACGTTCCT	TGGGGCCAAG	GAGGTGTCAC	TAAGCTATTC	AACTGGTGCA	CTTGCCAGTT
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	425	435	445	455	465	475
Segmento 7	GCATGGGCCT	CATATACAAC	AGGATGGGAA	CAGTGACCAC	AGAAGCTGCT	TTTGGTCTAG
pET19b-M1	GCATGGGCCT	CATATACAAC	AGGATGGGAA	CAGTGACCAC	AGAAGCTGCT	TTTGGTCTAG
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	485	495	505	515	525	535
Segmento 7	TGTGTGCCAC	TTGTGAACAG	ATTGCTGATT	CACAGCATCG	GTCTCACAGA	CAGATGGCTA
pET19b-M1	TGTGTGCCAC	TTGTGAACAG	ATTGCTGATT	CACAGCATCG	GTCTCACAGA	CAGATGGCTA
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	545	555	565	575	585	595
Segmento 7	CTACCACCAA	TCCACTAATC	AGGCATGAAA	ACAGAATGGT	GCTGGCTAGC	ACTACGGCAA
pET19b-M1	CTACCACCAA	TCCACTAATC	AGGCATGAAA	ACAGAATGGT	GCTGGCTAGC	ACTACGGCAA
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	605	615	625	635	645	655
Segmento 7	AGGCTATGGA	ACAGATGGCT	GGATCGAGTG	AACAGGCAGC	GGAGGCCATG	GAGGTTGCTA
pET19b-M1	AGGCTATGGA	ACAGATGGCT	GGATCGAGTG	AACAGGCAGC	GGAGGCCATG	GAGGTTGCTA
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	665	675	685	695	705	715
Segmento 7	ATCAGACTAG	GCAGATGGTA	CATGCAATGA	GAATATTGG	GAATCATCCT	AGCTCCAGTG
pET19b-M1	ATCAGACTAG	GCAGATGGTA	CATGCAATGA	GAATATTGG	GAATCATCCT	AGCTCCAGTG
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	725	735	745	755	765	775
Segmento 7	CTGGTCTGAA	AGATGACCTT	CTTGAAAATT	TGCAGGCCTA	CCAGAAGCGA	ATGGGAGTGC
pET19b-M1	CTGGTCTGAA	AGATGACCTT	CTTGAAAATT	TGCAGGCCTA	CCAGAAGCGA	ATGGGAGTGC
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	785	795	805	815	825	835
Segmento 7	AGATGCAGCG	ATTCAACAGT	-----	-----	-----	-----
pET19b-M1	AGATGCAGCG	ATTCAAGTAA	GTCGCTCTCG	AGCCAATCTT	TCTAGAAGAT	CTCCTACAAT
Comparación	*****	*****	-----	-----	-----	-----

Figura VI.1.10. Análisis de la secuencia de nucleótidos clonada en el vector pET19b-M1. En la primera línea observamos parte del segmento 7 que corresponde al gen M1. La segunda línea corresponde a la secuencia del fragmento clonada en el vector pET19b-M1. Los nucleótidos subrayados con una línea corresponden al sitio de inicio de la traducción, mientras que los nucleótidos subrayados con dos líneas al codón de paro de la traducción. En la tercera línea se muestra la comparación entre ambas secuencias y cada asterisco representa igualdad de base.

VI.1.5.- Expresión de la proteína M1

Después de comprobar que el gen que codifica para la proteína M1 estaba clonado en el vector de expresión pET19b-m-M1, con el marco de lectura adecuado y en la dirección correcta, se realizaron ensayos de sobreexpresión de la proteína M1. Para esto, se transformaron dos cepas de expresión de *E. coli*: BL21(DE3)pLysS y Rosetta-gami, probándose dos temperaturas diferentes: 30 y 37 °C de los cultivos. Después de inducir la sobreexpresión con 1 mM de IPTG, se tomaron alícuotas de los cultivos cada hora durante las primeras cuatro horas y una alícuota más a después de 21 h de la inducción (ON). La sobre-expresión de M1 se midió comprobando la presencia y aumento de intensidad de una banda de aproximadamente 27.5 KDa en geles de SDS-PAGE al 12 %. Es importante recalcar que la M1 analizada en el gel de poliacrilamida es proveniente de un extracto total a diferentes tiempos después de la inducción de los cultivos bacterianos.

En la figura VI.1.11 se observa que la cepa BL21(DE3) pLysS-pET19b-M1 presenta los mayores niveles de sobreexpresión tanto a 30 como a 37 °C después de tres horas de inducción con 1 mM de IPTG (ver carriles 5, paneles A y B de la figura VI.1.11). En tiempos subsecuentes la expresión de la proteína usando ambas temperaturas se mantuvo en niveles constantes (carriles 6 y 7, paneles A y B de la figura VI.1.11). Con esta cepa se alcanzaron mejores niveles de expresión de la proteína M1 a 30 °C.

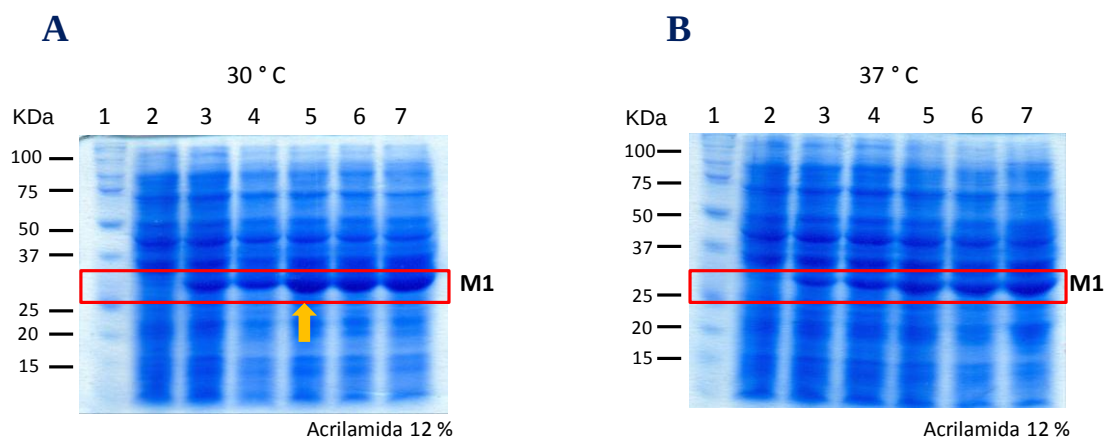


Figura VI.1.11. Cinética de expresión de la proteína M1 en la cepa de *E. Coli* BL21 (DE3)pLyS. **A.** Expresión a 30 °C, 1 mM de IPTG. **B.** Expresión a 37 °C, e inducción con 1 mM de IPTG. El carril 1 corresponde al marcador de masa molecular (KDa) (Bio Rad); el carril 2 corresponde a las condiciones control (tiempo cero de inducción); los carriles 3 - 6 pertenecen a la inducción 1 – 4 horas respectivamente; el carril 7 se muestra la inducción después de 21 horas. En el recuadro de color rojo se resaltan las bandas correspondientes a la proteína M1 (27.5 KDa). La flecha de color naranja muestra el tiempo en el que se obtienen los niveles máximos de expresión de M1. Geles de poliacrilamida al 12 %, teñidos con azul de Coomassie.

Los niveles de expresión de la proteína M1 en la cepa Rosetta-gami a 30 y 37 °C, se aprecian en la figura VI.1.12. El tiempo óptimo de sobre-expresión a 30°C se observa después de 21 horas (ON) de haber inducido con 1 mM de IPTG (carril 8, panel A), mientras que a 37 °C se observan bandas de intensidad similar desde las 3 y hasta 21 horas después de iniciar la sobreproducción de proteína (carriles 5 al 8 panel B).

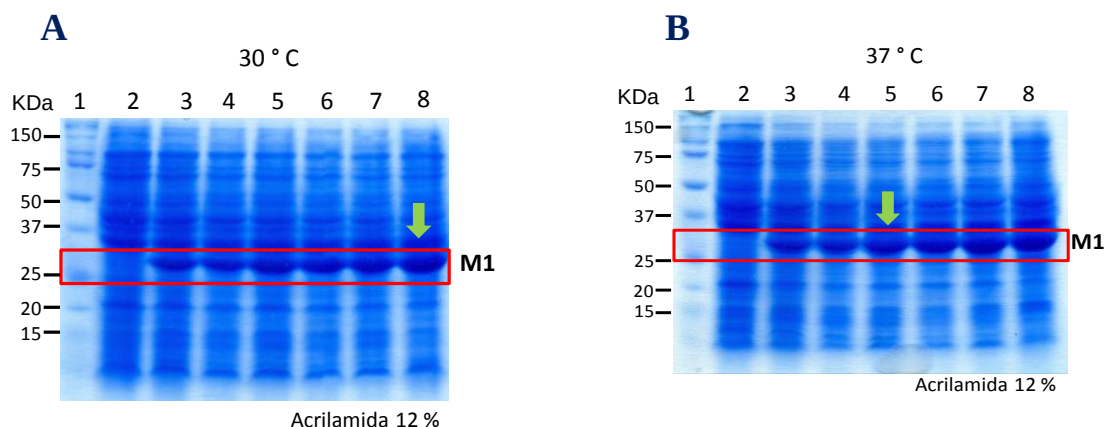


Figura VI.1.12. Cinética de expresión de la proteína M1 en la cepa de *E. coli* Rosetta-gami. **A.** Expresión a 30 °C; **B.** Expresión a 37 °C, 1 mM de IPTG. El carril 1 corresponde al marcador de masa molecular (KDa) (Bio Rad); el carril 2 corresponde a las condiciones control (tiempo cero de inducción); los carriles 3 - 7 pertenecen a la inducción 1 – 5 horas respectivamente; por último el carril 8 se muestra la inducción después de 21 horas. En el recuadro de color rojo se encuentran los niveles de expresión de M1, mientras que las flechas de color verde señalan los tiempos en el que se observó un mejor nivel de expresión de la proteína. Geles de poliacrilamida al 12 %, teñidos con azul de Coomassie.

Con estos resultados se determinó que las condiciones óptimas de sobreexpresión de M1 en *E. coli* se consiguen utilizando la cepa: Rosseta gami, incubándola a 37°C durante todo el cultivo y transcurridas tres horas después de agregar IPTG. Cabe señalar que en todas las condiciones ensayadas la proteína M1 se encontró en su totalidad en la fracción insoluble (en cuerpos de inclusión).

VI.1.6.- Purificación de la proteína M1

Por lo tanto la purificación de la proteína M1 se realizó a partir de los cuerpos de inclusión obtenidos de 200 ml de cultivo bajo condiciones desnaturizantes de 4 M de urea, mediante una cromatografía de afinidad (NiNTA). Los resultados de la purificación fueron visualizados en un gel de acrilamida al 12 % tal como se observa

en la figura VI.1.13. A partir de 200 ml de cultivo se obtuvieron aproximadamente 2.76 mg de M1 purificada, lo que representa un rendimiento de 13.8 $\mu\text{g/ml}$ de cultivo.

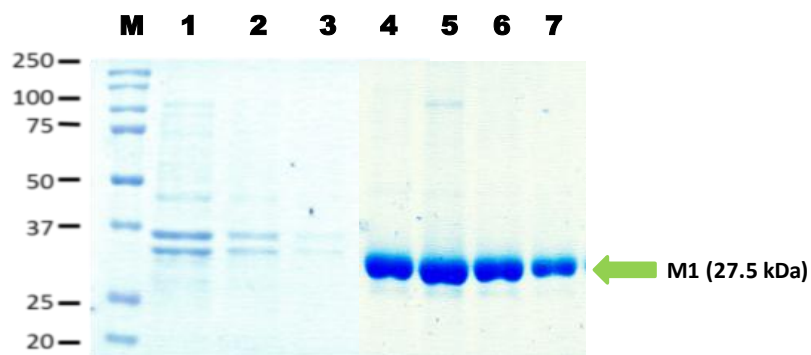


Figura VI.1.13. Purificación de M1 en condiciones desnaturalizantes 4 M urea. Carril M corresponde al marcador de masa molecular (Bio Rad); carril 1, fracción no unida a la columna; carriles 2 y 3, lavados de la resina NiNTA con el amortiguador de lavado; carriles 4 al 7, fracciones de elución de la proteína M1 con el amortiguador de elución. La flecha de color verde indica la posición de la proteína M1. Geles de poliacrilamida al 12 %, teñidos con azul de Coomassie.

La identidad de la proteína purificada se comprobó mediante un ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo primario contra el tracto de histidinas que tiene la proteína M1 en su extremo N-terminal. En la figura VI.1.14 se presentan los resultados de este ensayo. En el panel A se observa el gel de poliacrilamida y en el panel B se muestra la placa radiográfica de la membrana de nitrocelulosa, donde se aprecia que hay reconocimiento del anticuerpo α -his, únicamente en los eluidos, así como en el extracto total (obtenido después de solubilizar los cuerpos de inclusión).

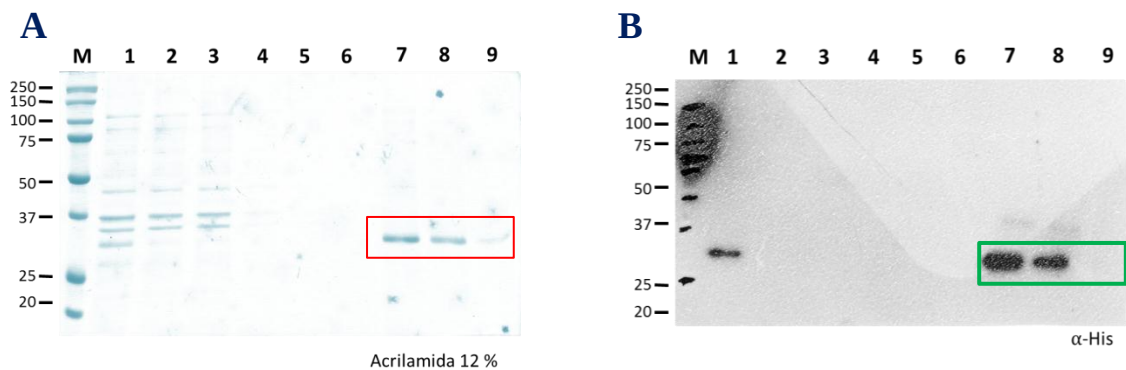


Figura VI.1.14. Western blot anti histidinas del amino terminal de M1. **A.** Gel de acrilamida en el que se visualiza la purificación de M1; carril M, marcador de masa molecular (Bio Rad); carril 1, extracto total después de haber purificado los cuerpos de inclusión; carriles 2 al 6, fracciones correspondientes a los lavados de la resina; carriles 7 al 9 corresponden a las fracciones de elución de M1. En el recuadro rojo se resalta a M1 pura. **B.** Western blot α -hist. Únicamente se observan bandas de reconocimiento en el carril marcado con el numero 1 el cual corresponde al extracto total después de haber purificado los cuerpos de inclusión, así como en los carriles 7 y 8 los cuales corresponden a las fracciones de elución de la proteína M1. En el recuadro verde se resaltan las señales que se obtuvieron después del reconocimiento del anticuerpo α -His. Gel de poliacrilamida al 12 %, teñidos con azul de Coomassie.

VI.1.7.- Caracterización de la estructura terciaria de M1

Después haber intentado eliminar la urea de la solución que contenía a la proteína M1, esto mediante dos procesos: diálisis o en columna (NiNTA). Este método tenía la finalidad de favorecer el replegamiento de M1, sin embargo, los intentos de replegarla fueron fallidos, ya que cuando se analizó sus estructuras secundarias mediante dicróismo circular, se pudo apreciar un espectro de una proteína carente de los elementos de estructura secundaria característicos de M1, donde el espectro de la proteína M1 se encontraba con unos valores cercanos a cero, indicio que la proteína se encontraba desestructurada, comparado con el espectro de la proteína M1 bien plegada que reporta Arzt y colaboradores en el 2001 (ver figura VI.1.15).

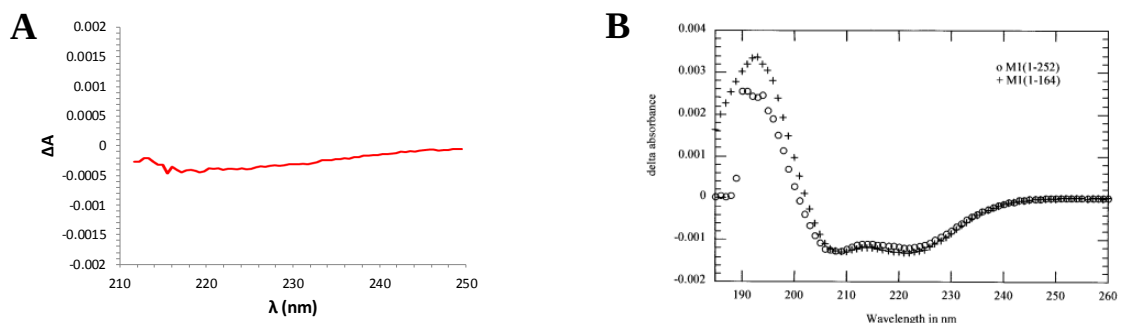


Figura VII.1.15. Espectros de dicróismo de la proteína M1. **A.** Espectro de la proteína M1 después de haberla dializado. **B.** Espectro de la proteína M1, en círculos se muestra a la proteína completa; en cruces se muestra únicamente a la fracción comprendida entre el aminoácido 1 al 164.

VI.2.- *In silico*

Se realizó una búsqueda en la base de datos de NCBI de todas las secuencias de nucleótidos del gen M1 del virus de la influenza A H1N1 reportadas en el 2009 (exclusivas de México), encontrándose 102 secuencias (dato no mostrado). Debido a que se observaron mutaciones puntuales entre ellas, en las posiciones 6, 8, 9, 10, 36, 89, 111, 125, 147, 315, 339, 399, 438, 477, 492, 522, 539, 552, 587, 600, 614, 696, 729 y 741, se decidió obtener la secuencia del gen M1 más representativa (secuencia consenso) de las 102 obtenidas. Esta secuencia constó de 759 pares de bases, mostrada en la figura VI.2.1.

ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTACGTTCTTTCTATCATCCCGTCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGATCGCGCAGAG
ACTGGAAAGTGCTTTGCAGGAAAGAACACAGATCTTGAGGCTCTCATGGAATGGCTAAAGACAAGACCAATCTTGTCA
CCTCTGACTAAGGGAATTTTAGGATTTGTGTTACGCTCACCGTGCCAGTGAGCGAGGACTGCAGCGTAGACGCTTTGT
CCAAAATGCCCTAAATGGGAATGGGGACCCGAACAACATGGATAGAGCAGTTAACTATACAAGAAGCTCAAAGAGA
AATAACGTTCCATGGGGCCAAGGAGGTGTCACTAAGCTATTCAACTGGTGCACTTGCCAGTTGCATGGGCCTCATATACA
ACAGGATGGGAACAGTGACCACAGAAGCTGCTTTTGGTCTAGTGTGTGCCACTTGTGAACAGATTGCTGATTACAGCA
TCGGTCTCAGACAGATGGCTACTACCACCAATCCACTAATCAGGCATGAAAACAGAATGGTGCTGGCTAGCACTACG
GCAAAGGCTATGGAACAGATGGCTGGATCGAGTGAACAGGCAGCGGAGGCCATGGAGGTTGCTAATCAGACTAGGCA
GATGGTACATGCAATGAGAACTATTGGGACTCATCTAGCTCCAGTGCTGGTCTGAAAGATGACCTTCTGAAAATTTGC
AGGCCTACCAGAAGCGAATGGGAGTGCAGATGCAGCGATTCAAGTGA

Figura VI.2.1. Secuencia consenso del gen M1 del virus de la influenza A/H1N1/2009-Mexico. Esta secuencia consenso es exclusiva de virus aislados de pacientes mexicanos, reportados en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/>). El triplete que codifica para el primer aminoácido está subrayado y resaltado en negritas.

Posteriormente se utilizó la herramienta bioinformática disponible vía Internet “Translate” (<http://expasy.org/tools/dna.html>) para obtener la secuencia de aminoácidos de la proteína M1, utilizando como template el gen M1, obteniéndose 252 aminoácidos los cuales son mostrados en la figura VI.2.2.

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
   5          15          25          35          45          55
MSLLTEVETY VLSIIPSGPL KAEIAQRLES VFAGKNTDLE ALMEWLKTRP ILSPLTKGIL

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
   65          75          85          95          105         115
GFVFTLTVPS ERGLQRRRFV QNALNGNGDP NNMDRAVKLY KKLKREITFH GAKEVSLSYS

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  125         135         145         155         165         175
TGALASCMGL IYNRMGTVTT EAAFGLVCAT CEQIADSQHR SHRQMATTN PLIRHENRMV

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
  185         195         205         215         225         235
LASTTAKAME QMAGSSEQAA EAMEVANQTR QMVHAMRTIG THPSSSAGLK DDLENLQAY

.....|.....| ..
  245         252
QKRMGVQMQR FK

```

Figura VI.2.2. Secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la secuencia consenso del gen M1. Esta secuencia consta de 252 aminoácidos;

Lo importante del análisis mostrado en la figura VI.2.2, era definir una secuencia representativa de la proteína para virus aislados de pacientes mexicanos durante la pasada pandemia del 2009.

Posteriormente se construyó un modelo tridimensional (3D) de la proteína M1/A/H1N1/2009. Para ello se utilizó el servidor disponible en línea **ITASSER** (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), el cual fue alimentado con la secuencia de aminoácidos obtenida previamente (figura VI.2.2). De este modelador se obtuvieron 5 modelos, de los cuales se seleccionó el número 1 debido a que era el que se apegaba más a los criterios que dictan la calidad C-score (un valor cercano a 1 define una fuerte correlación con el modelo predicho) y TM-score (toma valores [0, 1] y entre más alto sea el valor define que hay mucha similitud entre las topologías de dos estructuras de proteínas). Nuestro modelo tenía los siguientes valores: C-score: -2.30 y TM-score: 0.44 ± 0.14 . Este modelo consta de trece α -hélices (representadas de H1 a H4, H6 a H9 y de H10 a H14) y una hélice- 3_{10} (H5) (ver figura VI.2.3). Es interesante recalcar que la porción de la proteína M1 del virus de la influenza A/H1N1/Puerto Rico/8/34 que se conoce por análisis cristalográfico por difracción de rayos X (1) abarca de la α -hélices H1 a H9 (correspondientes a los primeros 162 aminoácidos), por lo tanto esta porción fue modelada por homología en base a los cristales ya reportados, mientras que la porción comprendida entre las hélices H10 – H14 fueron modeladas en base a las propiedades físicas (polaridad y tamaño) de los aminoácidos que la conforman (ver figura VI.2.3).

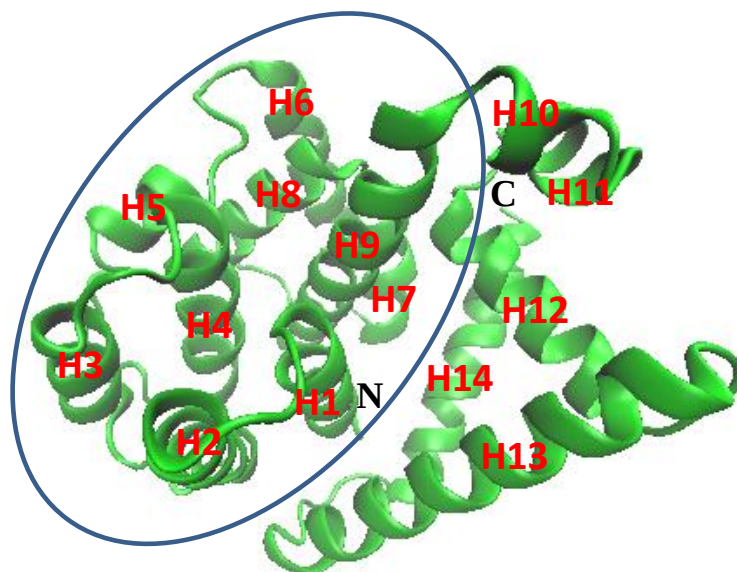


Figura VI.2.3. Modelo tridimensional de la proteína M1. Este modelo consta de 13 hélices- α (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H11, H12, H13, H14) y una hélice 3_{10} . (H10). En el óvalo de color azul se ubica a la porción de la proteína que se ha podido cristalizar por difracción de rayos X (1). N representa el amino y C el carboxilo terminal.

Posteriormente para validar el modelo de M1 y determinar si los ángulos phi y psi se encontraban dentro de los parámetros permitidos, se construyó el gráfico de Ramachandran con el software en línea **MolProbity** (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>). Se obtuvo que el 93.2 % de todos los aminoácidos que componen a la proteína M1 se encuentran dentro de las regiones permitidas mientras que 6.8 % que no lo están y corresponden a los aminoácidos: Ser 2, Pro 50, Ile 51, Pro 69, Gly 73, Leu 74, Gln 75, Arg 77, Asn 87, Ser 120, Arg 163, Pro 171, Asn 177, Ser 195, Ser 225, Leu 229. Además se puede observar que la gran mayoría de los aminoácidos se encuentra dentro de la región que corresponde a las hélices (cuadrante inferior izquierdo de la figura VI.2.4; comprendido del eje “y” entre 0 y -180 y del eje “x” entre -180 y 0), (ver figura VI.2.4).

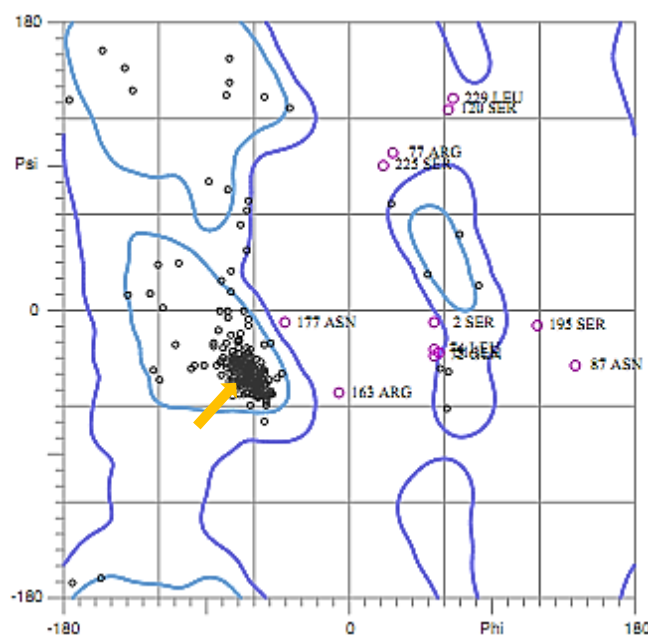


Figura VI.2.4. Gráfico de Ramachandran del modelo tridimensional de la proteína M1. El eje de las “y” representa a los ángulos psi; el eje de las “x” representa a los ángulos phi de la cadena principal de la proteína. Los límites marcados con azul marino representan a las regiones favorecidas, mientras que las marcadas con azul cielo representan a las regiones de los ángulos permitidos. Se puede observar que la mayor cantidad de puntos convergen a la región de las hélices alfa (señalado con la flecha de color amarillo). Los aminoácidos que se salen de estas regiones, están resaltados con pequeños círculos de color rosa.

Una vez determinado que nuestro modelo 3D de la proteína M1 tenía una buena calidad en base al gráfico de Ramachandran y a los valores C-score y TM-score (proporcionados por el modelador ITASSER) entonces se prosiguió a realizar las respectivas simulaciones de la dinámica molecular de las etapas iniciales del desplegamiento inducido por temperatura a tres diferentes temperaturas: 300, 400 y 500 K, por un tiempo de simulación de 20 ns, utilizando el software gromacs.

Es necesario mencionar que existen varios parámetros que pueden ser utilizados para evaluar el comportamiento de la proteína M1 a lo largo de los 20 ns de simulación. Algunos estos son: RMSD, RMSF, el radio de giro, área de exposición al solvente, puentes de hidrógeno y cambios de las estructuras secundarias.

En primer lugar se analizó el parámetro RMSD que nos va a proporcionar información de la desviación cuadrática media de los carbonos- α de M1 (desplazamiento de una posición con respecto a una anterior). En la figura VI.2.5 se muestra el gráfico de

RMSD de las tres diferentes temperaturas. Podemos notar que a una temperatura de 300 K (curva de color azul), M1 alcanza un equilibrio en 0.3 nm después de 5 000 ps de simulación. Mientras que a una temperatura de 400 K (curva de color rosa) se puede observar que M1 alcanza un primer equilibrio de los 4 000 a los 8 000 ps (con un desplazamiento de 0.8 nm). Posteriormente hay cambios considerables en la estructura de M1 de los 8 000 a los 16 000 ps de simulación. Finalmente hay un segundo equilibrio en la estructura que va de los 16 000 a 20 000 ps de la simulación. En lo que respecta a la temperatura de 500 K (curva de color rojo), se puede observar que la estructura de M1 está en constante movimiento y al parecer alcanza un equilibrio después de los 17 500 ps (con un desplazamiento de aproximadamente 1.5 nm).

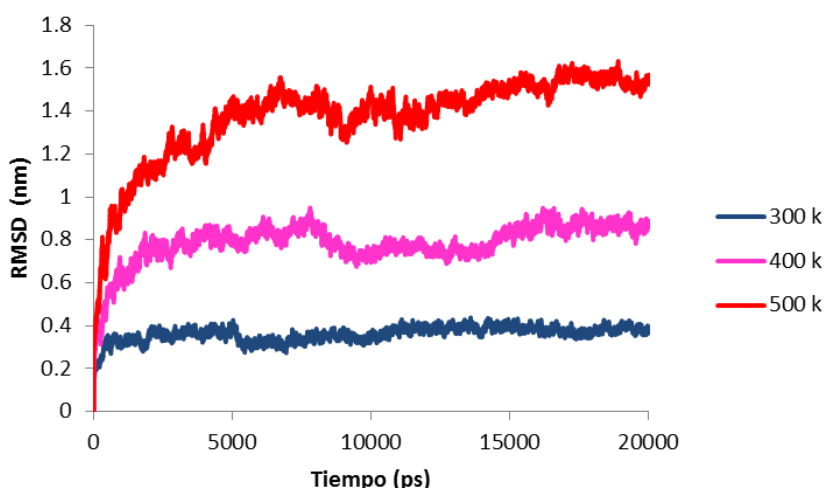


Figura VI.2.5. RMSD de la cadena principal de M1 a tres diferentes temperaturas de simulación. El color azul representa a la temperatura de 300 K; la curva de color rosa representa a 400 K; la curva de color rojo representa a 500 K

El segundo parámetro que se utilizó fue el RMSF; este mide el grado de fluctuación de los carbonos α de M1. Analizando las tres curvas podemos denotar que muestran un patrón muy parecido. Podemos observar que los patrones de fluctuación entre 300 y 400 K son muy similares, sin embargo, cuando la proteína es calentada a 500 K, hay varios C- α que cambian de estado, por ejemplo los aminoácidos que pasan de un estado de rigidez (con respecto a las dinámicas de 300 y 400 K) a un estado de mayor movilidad son: R76, R77, R78, E152 y Q211. Otros que cambian de estado de movilidad a rigidez (con respecto a las dinámicas de 300 y 400 K) tales son: N92, E197 y Q238. Sin embargo es interesante resaltar que existen aminoácidos que se mantienen rígidos en las simulaciones a las tres diferentes temperaturas probadas en este trabajo: E40 (H3), P90 (H6), L124 (H8), E141 (H9) y L234 (H14) (ver figura

VI.2.6). De acuerdo a estos resultados podemos deducir que las regiones rígidas de M1 podrían ser puntos clave para evitar el desplegamiento total de la proteína.

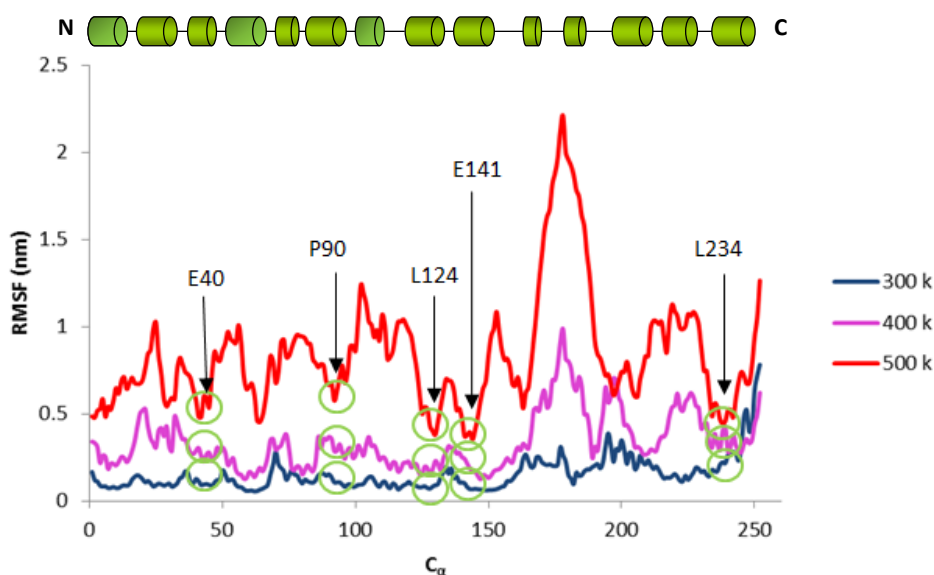


Figura VI.2.6. RMSF de los C-α de M1. En los óvalos de color verde se muestran a los aminoácidos que se mantienen rígidos en las tres temperaturas analizadas.

Un tercer parámetro utilizado fue el radio de giro (R_g), que nos da información del grado de compactación de la proteína. Podemos observar a 300 K el radio de giro de M1 oscila alrededor de un valor de 1.89 nm a lo largo de la simulación de la dinámica molecular. En lo que respecta a 400 K se observa que al inicio de la dinámica existe una ligera expansión hasta los 2.00 nm, alrededor de los 2 000 ps, posteriormente hay una compactación gradual hasta alcanzar aproximadamente 1.92 nm alrededor de los 9 000 ps. Después de alcanzar este valor, el R_g de M1 no sufre más cambios importantes y a los 20000 ps el valor de R_g es ligeramente mayor con respecto a 300 K (ver figura VI.2.7).

Finalmente a 500 K, la proteína está en constante compactación y expansión (teniendo un máximo de 2.15 nm entre los 8 000 y los 12 000 ps), sin embargo, se puede observar que después de los 16 000 ps hay una compactación, alcanzando un valor promedio R_g de 1.85 nm el cual se mantiene hasta el final de la dinámica. También es interesante resaltar que la proteína al final de la dinámica a esta temperatura se encuentra más compacta que a 300 y 400 K (ver figura VI.2.7).

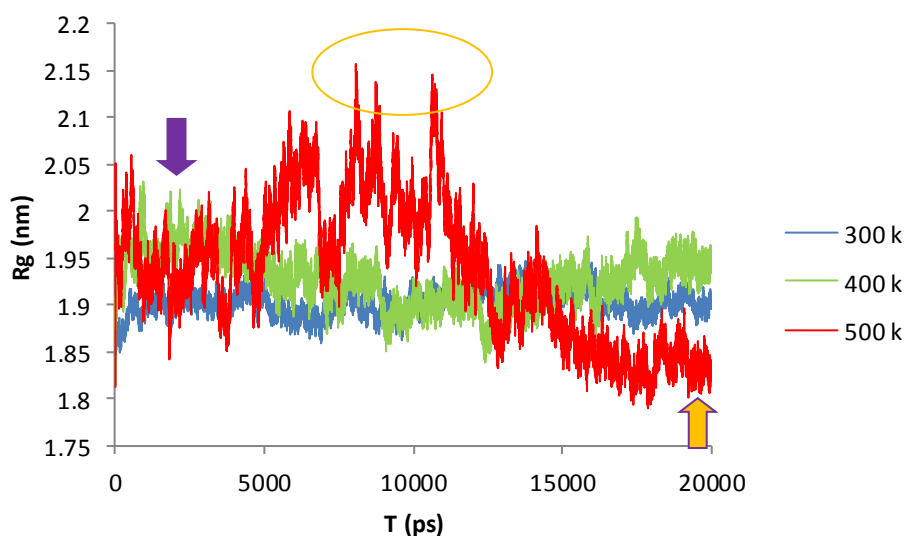


Figura VI.2.7. Radio de giro de M1. La flecha de color morado muestra los puntos máximos de la temperatura de 400 K; el ovalo de color naranja se resalta la máxima expansión de la temperatura de 500 K, mientras que la flecha de color naranja muestra la máxima compactación a esta misma temperatura. El valor de la estructura inicial antes de iniciar las simulaciones fue de 1.86 nm.

Un cuarto parámetro fue el SASA; este nos da información del cambio de área de exposición al solvente que va teniendo la proteína a lo largo de toda la simulación de la dinámica molecular. Analizando las tres temperaturas probadas en este experimento, se puede apreciar que las tres curvas tienen un mismo patrón, siendo la de 300 y 400 K casi superponibles, mientras que la de 500 K tiene una mayor área de exposición al solvente que las dos anteriores (una diferencia de 15 nm^2), tal como se observa en la figura VI.2.8. Además el área final de exposición al solvente que alcanza M1 al final de la dinámica fue de 140 nm^2 , comparado con los 120 nm^2 que tiene el control de 300 K.

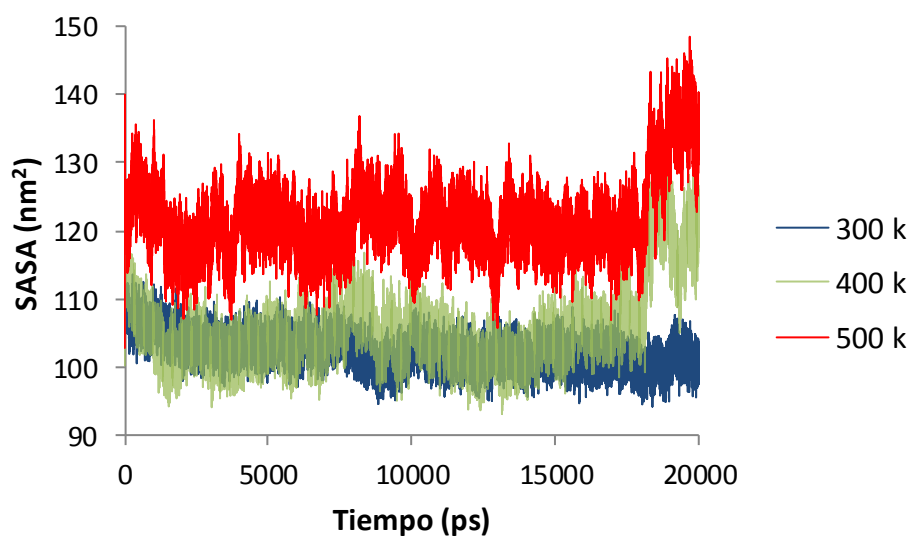


Figura VI.2.8. Área de exposición al solvente (SASA) de M1.

Un quinto parámetro utilizado fue el análisis del número de puentes de hidrógeno que gana o pierde la proteína a lo largo de la dinámica. Tanto a 300 como a 400 K la proteína mantiene en promedio 171 y 174 puentes de hidrogeno respectivamente, no obstante a 500 K la proteína pierde contactos de hidrógeno con respecto a 300 y 400 K, debido a que mantiene en promedio 145 puentes de hidrogeno (ver figura VI.2.9).

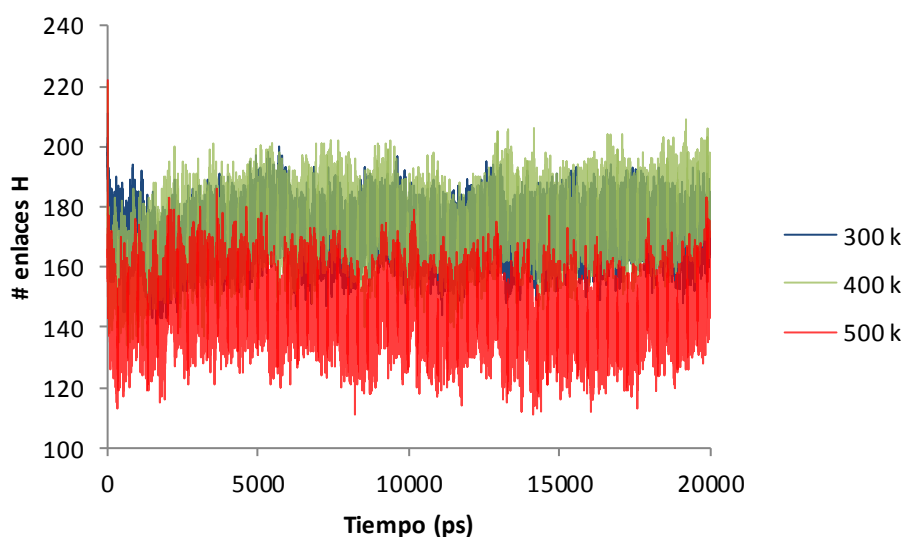


Figura VI.2.9. Enlaces de hidrógeno que presenta M1 durante la simulación de la dinámica molecular.

Para evaluar los cambios en la estructura secundaria que sufre M1 a través de los 20 000 ps de simulación, fue necesario construir tres gráficos, uno para cada temperatura. En el primer caso a 300 K, se puede observar que la proteína M1 conserva la mayor parte de su conformación helicoidal, a excepción de la hélice 10, que se observa menos estructurada desde los 5 000 ps y hasta los 15 000 ps, tiempo en el cual adopta una estructura de giro (tal como refiere la flecha de color negra, del panel A de la figura VII.2.10) Otro dato importante, es que la hélice 1 adopta una estructura de hebra- β entre los 11 000 a los 16 000 ps (ver flechas de color naranja del panel A de la figura VI.2.10).

Ahora bien, analizando los cambios estructurales de M1 a 400 K, encontramos que varias hélices pierden totalmente su conformación, como la H1, H2, y parcialmente como las H5, H11, H12, H13 y H14. Sin embargo a principios de la dinámica entre los 2 000 y 4 000 ps en la región que corresponde a la H5, se forma parcialmente una pequeña hebra beta. Asimismo se muestra que también existen otras regiones que son muy estables a esta temperatura como tal es el caso de H4, H6, H7, H8, H9 (ver panel B de la figura VI.2. 10).

En lo que respecta a la simulación a la temperatura de 500 K, podemos observar que en el inicio de la dinámica casi todas las estructuras secundarias de M1 (H1, H2, H3, H4, H5, H7, H8, H11, H13, H14) se pierden en su totalidad. Sin embargo, existen otras que son más estables, tal es el caso de H12 que se pierde hasta los 15 000 ps de simulación. Además también hay ligeros rastros de la estructura H9 al final de la dinámica. Es de llamar la atención que existe una región de la proteína que es muy estable a lo largo de la simulación y que comprende la H6 (cualitativamente mantiene al menos un $\frac{1}{4}$ de su estructura original, además gana una estructura adicional, una pequeña hebra- β), las nuevas estructuras que adquirió la proteína después de los 20 000 ps de simulación a 500 K fueron en su gran mayoría conformaciones “bend”, “turn”, “coil-coil” y 5 hojas beta en las regiones que corresponderían a parte de las hélices H1, H6, H7, H18, H12 (ver panel C de la figura VI.2.10).

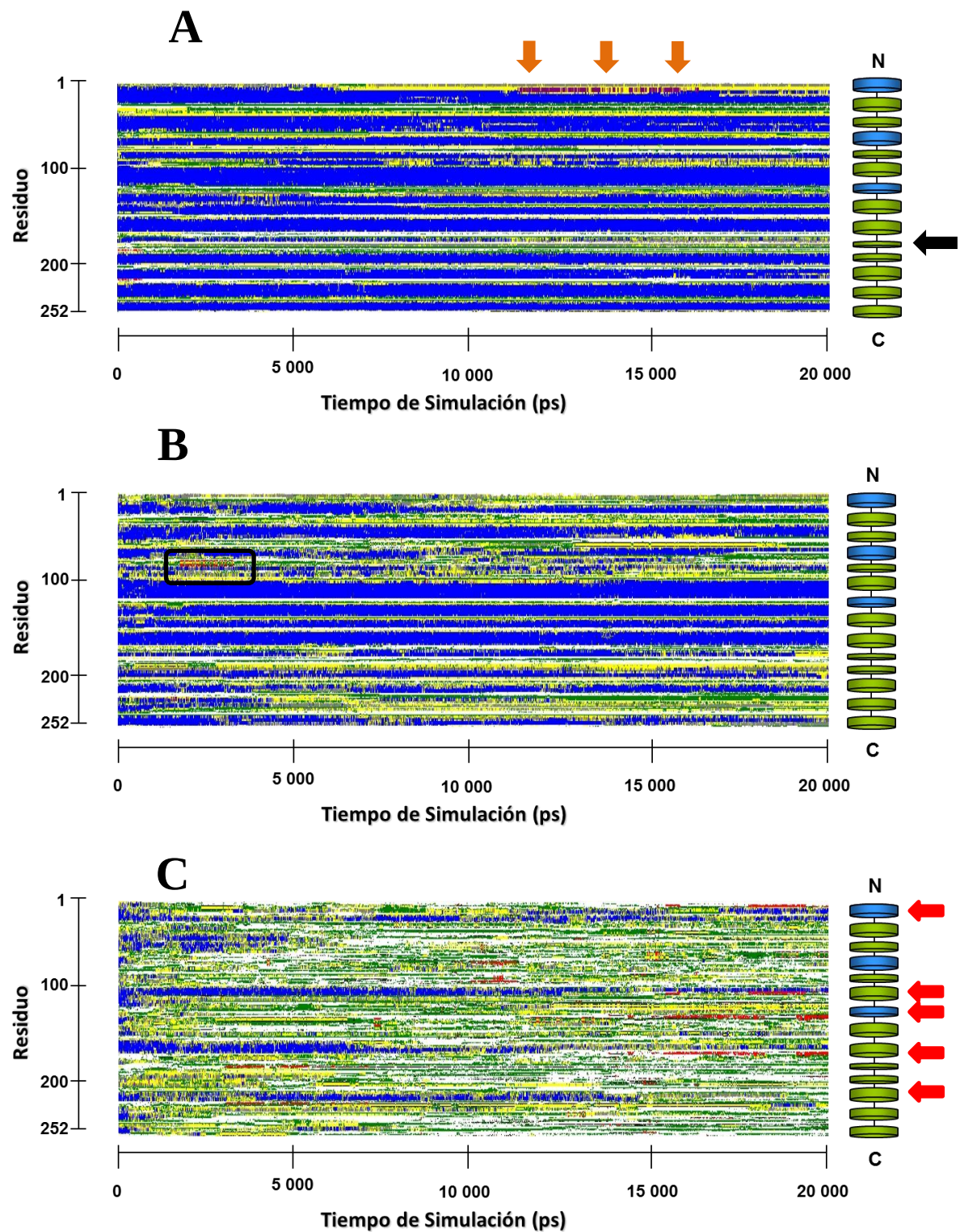


Figura VI.2.10. Mapas de los cambios de estructura secundaria de M1, a través de los 20 000 ps de simulación. **A.** Mapa correspondiente a la temperatura de 300 K las flechas de color naranja de la parte superior refieren a una estructura beta que se forma, mientras que la flecha de color negra del lado derecho refiere a H5; **B.** Mapa correspondiente a la temperatura de 400 K, el recuadro de color negro resalta la hoja beta que se forma a inicios de la dinámica en la región de la H5. **C.** Mapa correspondiente a la temperatura de 500 K, las flechas de color rojo localizadas al lado derecho de este esquema muestran la posición donde se localizan las estructuras β formadas al final de la simulación.

Posteriormente se realizó un análisis de la estructuras tridimensionales que se obtuvieron al final de los 20 000 ps de simulación de M1 a las tres diferentes temperaturas (300, 400 y 500 K). Para poder realizar una comparación equitativa con el control de 300 K, se realizaron dos superposiciones de las estructuras finales después de 20 000 ps de simulación: **A)** 300K con 400 K, para analizar la estructura de 400 K; **B)** 300 K con 500 K, para analizar la estructura de 500 K.

A) Superposición de las estructuras de 300 – 400 K: Para facilitar la descripción de este resultado se hicieron tres grupos:

- 1) Sin cambio aparente: donde se encuentran cuatro hélices H1, H7, H8 y H9
- 2) Donde hay pérdida de al menos el 50 % de la hélice: ubicándose en este grupo las hélices H1, H3, H4, H11, H12, H13 y H14;
- 3) Pérdida de la estructura de más del 50 % de la hélice: sólo se encuentran la H2 (pérdida total) y H5 (pérdida de más del 90 %).

Podemos observar que a 400 K la proteína guarda gran parte de sus estructuras secundarias (ver figura VI.2.11).

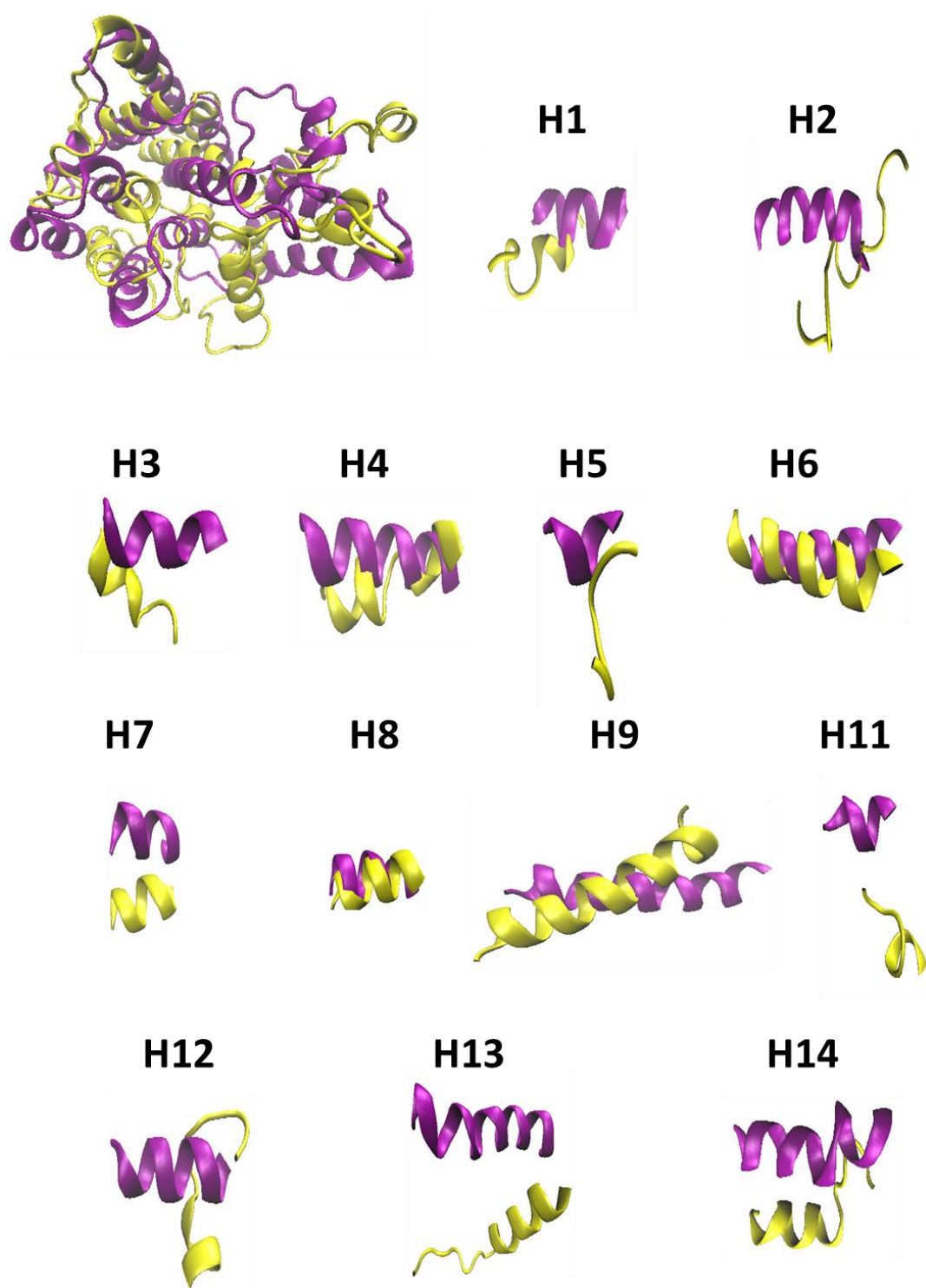


Figura VI.2.11. Superposición de las estructuras finales obtenidas después de los 20 000 ps de simulación de 300 y 400 K. En morado se simboliza a M1-300 K y el color amarillo simboliza a la estructura M1-400 K. En la esquina superior izquierda se encuentra la superposición de la proteína completa de 300 – 400 K. En el resto de la figura se esquematiza la comparación de todas las hélices de la proteína M1, haciendo énfasis en aquellas que son muy estables como la 6, 7, 8 y 9.

B) Superposición de las estructuras de 300 – 500 K: Analizando las estructuras secundarias que se mantienen al final de la simulación, pudimos percatarnos de que había ligeros remanentes de las hélices H2, H6 y H9, sin embargo, la estructura de la H6 es una estructura sumamente estable, tal vez gracias a la composición de aminoácidos que tiene (PNNMDRAVKLYKKLKRE) y la hélice H14 mantiene más del 50 % de su estructura, por lo que, podemos sugerir que de todas las hélices que componen a M1, es ésta última la más estable.

Además de perder M1 su estructura terciaria casi en su totalidad, también podemos resaltar que se formaron hebras- β importantes en las regiones correspondientes a las H6, H8, H9, H12 y H14 (ver figura VII.2.12) y tras dos más pequeñas a partir de estructuras que originalmente eran giros.

Las hebras β previamente mencionadas forman tres pares:

- a) Uno paralelo: entre la B1 (residuos 88, 89, 90) y la B2 (residuos 128 y 129)
- b) Dos antiparalelos: entre la B3 (residuos 154 y 155) y la B6 (residuos 246 y 247); entre B4 (residuos 192, 193, 194) y B5 (residuos 197 y 198) (ver figura VII.2.12). Estas estructuras beta que se están formando posiblemente le den mayor compactación a M1 tal como lo reflejan los datos del radio de giro.

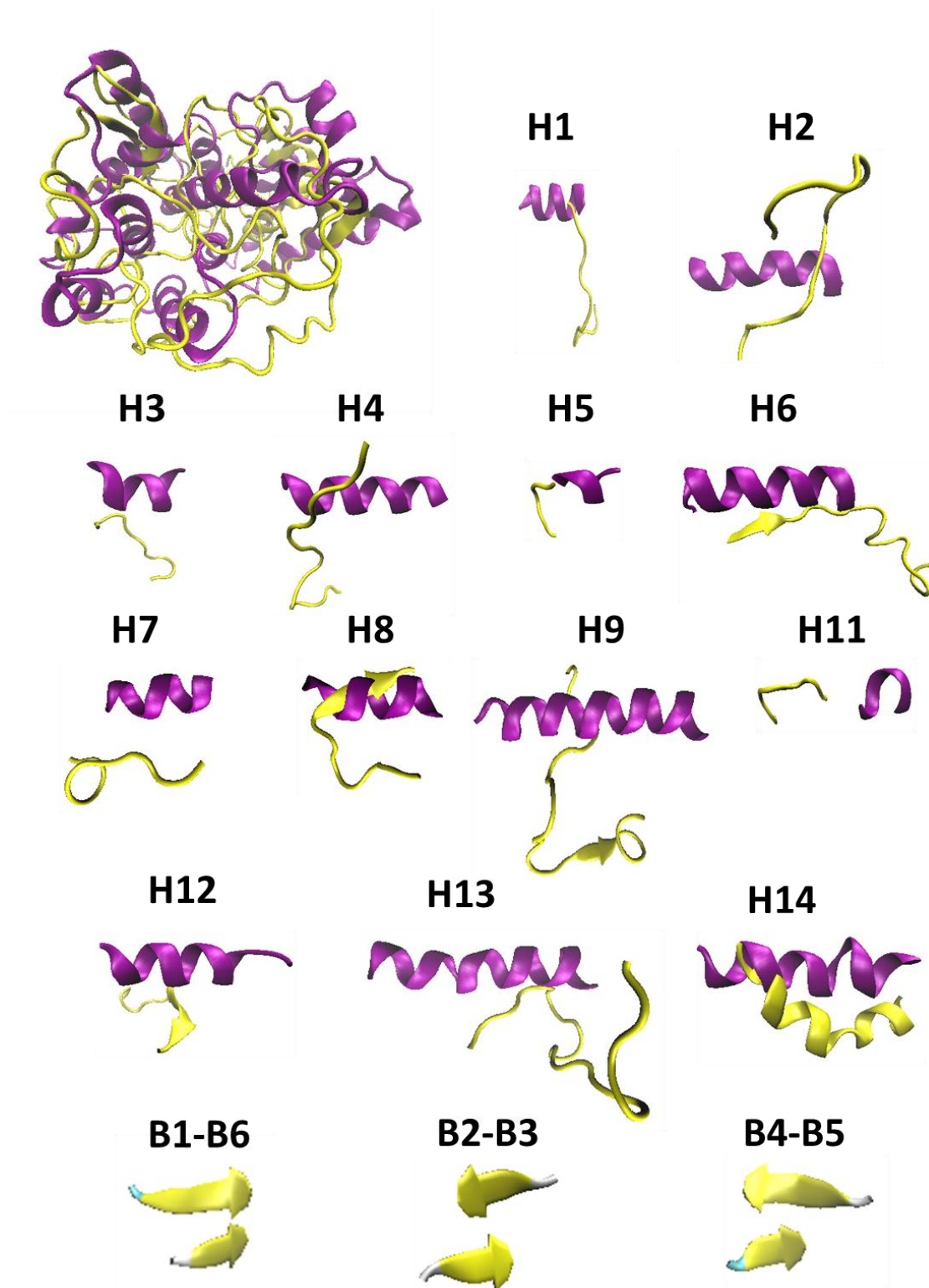


Figura VI.2.12. Superposición de las estructuras finales obtenidas después de los 20 000 ps de simulación, entre 300 y 500 K. En morado se simboliza a M1-300 K y el color amarillo simboliza a la estructura M1-500 K. En la esquina superior izquierda se encuentra la superposición de la proteína completa de 300 – 500 K. En el resto de la figura se esquematiza la comparación de todas las hélices de la proteína M1, así como los pares de hebras beta que se forman, ver la parte inferior de la figura.

Con el software disponible en internet ESBRI (<http://bioinformatica.isa.cnr.it/ESBRI/introduction.html>) se calcularon los puentes salinos que están presentes en cada una de las estructuras de M1 que se obtuvieron al final de los 20 000 ps de simulación. A 300 K se obtuvieron 45 puentes, la estructura de 400 K contenía 66 puentes y la 500 K tenía 74 puentes salinos. Es interesante notar que a una temperatura más elevada se forma una mayor cantidad de puentes salinos, factor por el cual se favorezca la compactación de la proteína tal como se observa con el radio de giro. Al mismo tiempo pude notar que a pesar de que existe diferencia entre la cantidad de puentes entre cada temperatura, hay 4 puentes **1)** NH₁ Arg77 – OE₁ Glu40, **2)** NZ Lys98 – OD₂ Asp94, **3)** NH₂ Arg134 – OE₁ Glu71 y **4)** NH₂ Arg217 – OD₂ Asp231) que se mantienen desde los 300, 400 y 500 K, aunque con diferente distancia, pero nunca superando los 4 °A (límite máximo de este enlace). Estas distancias fueron corroboradas con el software Swiss Prot Viewer y efectivamente se encuentran dentro del rango de 4 °A (ver figura VI.2.13). Estas distancias se muestran en la tabla VI.2.1.

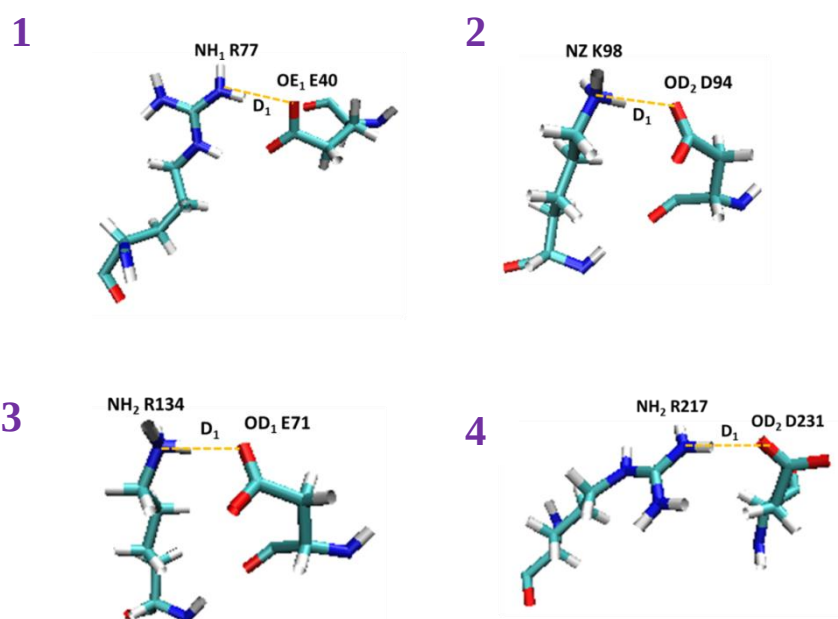


Figura VI.2.13. Estructuras 3D, representativas de los aminoácidos que forman los cuatro puentes salinos que se mantienen a las tres temperaturas de simulación (300, 400 y 500 K). El número 1 corresponde al puente NH₁ Arg77 – OE₁ Glu40; el número 2 representa al puente NZ Lys98 – OD₂ Asp94; el número 3 corresponde al puente NH₂ Arg134 – OE₁ Glu71; el número 4 corresponde al enlace NH₂ Arg217 – OD₂ Asp231. El símbolo NH₁ refiere al grupo amino uno de la cadena lateral de la Arginina; NZ, representa el grupo amino de la cadena lateral de la lisina; NH₂ corresponde al grupo amino número dos de la cadena lateral de la Arginina; OE₁, simboliza el Oxígeno número uno de la cadena lateral del ácido Glutámico 40 y 71; OD₂, corresponde al oxígeno dos de la cadena lateral del ácido Aspártico 94 y 231

Tabla VI.2.1. Distancias que mantienen los cuatro puentes salinos que comparten las tres temperaturas de simulación. La distancia del enlace se representa con la letra D₁.

Puente Salino	Distancias a distintas temperaturas de simulación (°A)		
	<u>300 K</u>	<u>400 K</u>	<u>500 K</u>
1) NH₁ Arg77 – OE₁ Glu40	3.39	3.05	2.80
2) NZ K98 – OD₂ Asp94	3.41	2.65	3.24
3) NH₂ Arg134 – OE₁ Glu71	2.87	2.67	3.30
4) NH₂ Arg217 – OD₂ Asp231	2.65	3.52	4.01

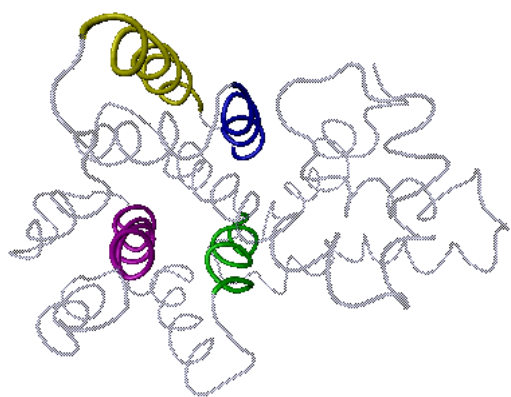
Se realizó un análisis a lo largo de los 20 000 ps de simulación tomando imágenes a los 0, 5 000, 10 000, 15 000 y 20 000 ps a las tres diferentes temperaturas de simulación (300, 400 y 500 K) del comportamiento de las estructuras de M1 que toman participación en las diferentes funciones que desempeñan esta proteína. Por ejemplo se analizaron las hélices 1, 4 y 7, ya que de acuerdo a la literatura, éstas tienen participación en la inserción dentro de la envoltura del virión y la hélice 6 interacciona electrostáticamente con ella además de que se le han atribuido otras funciones como las mencionadas en la introducción.

Durante este proceso se analizó el comportamiento de la estructura 3D que adoptan las hélices ya mencionadas a lo largo de la los 20 000 ps de simulación, además de analizar la red de puentes de hidrógeno que se pierden o se ganan dentro de las estructuras analizadas. Observándose que a 300, 400 y 500 K las redes de puentes de hidrógeno no se mantienen constantes en ninguna: H1, H4, H6 y H7. En el caso particular de 300 K se puede notar que la configuración que adoptan las hélices analizadas no varían con respecto al modelo construido. En lo que respecta a la red de puentes de hidrógeno, a esta temperatura, podemos observar que de las hélices analizadas, la H6 es la que tiene un número mayor de estos puentes a las los diferentes tiempos muestreados (ver figura VI.2.14) lo que podría explicarse probablemente por la naturaleza de los aminoácidos que la componen (la gran mayoría son residuos cargados positivamente).

En lo que respecta a la dinámica de la temperatura de 400 K, podemos observar que la región amino de la H1 es la menos estable debido a que es la primera región que tiende a desestabilizarse y mantenerse a lo largo del tiempo de simulación, sin embargo la región carboxilo-terminal de la hélice 4 tiende a ser menos estable que el resto de esta. La estructura de la hélice 6 es muy estable a lo largo de los 20 000 ps de simulación, pero pese a ello podemos observar que en el tiempo de 15 000 ps una porción de la región amino de esta hélice tiende a desestabilizarse pero termina por recuperar su estructura 3D original cuando se muestrea en un tiempo de 20 000 ps. En lo que respecta a la H7, es estructuralmente muy estable a lo largo de los 20 000 ps de simulación (ver figura VI.2.14). La simulación por dinámica molecular a esta temperatura también nos permitió predecir y entender la dinámica de las H1 y H4 (las cuales se encuentran en el núcleo hidrofóbicos de M1), observándose que gradualmente el amino de H1 y el carboxilo de H4 se exponen al solvente (ver modelo completo de M1 de la figura VI.2.15).

Un nivel mayor de estrés de la proteína M1 se logró sometiendo su modelo 3D a una temperatura elevada, en este caso 500 K. Pudimos notar que las hélices H1, H4 y H7 pierden gradualmente su estructura 3D y después de los 5 000 ps ese cambio es muy marcado. De manera específica en la H1 se puede observar la formación de un “loop” (8ETYVL12) que queda accesible al solvente (en condiciones nativas se encuentra oculto al solvente) (ver figura VI.2.16). En la H4 pasa un proceso muy similar salvo que se forman dos loops que están accesibles al solvente (56TLG58 y 61DFV63), aún cuando en condiciones nativas la H4 está totalmente oculta al solvente (ver figura VI.2.17).

La H6 tiende a ser más estable debido a que mantiene al menos $\frac{1}{4}$ parte de su estructura 3D en su porción central, aún cuando se han perdido las porciones amino y carboxilo de su estructura a lo largo del tiempo de simulación de la dinámica molecular (ver figura VI.2.16).



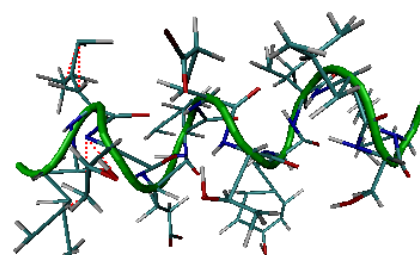
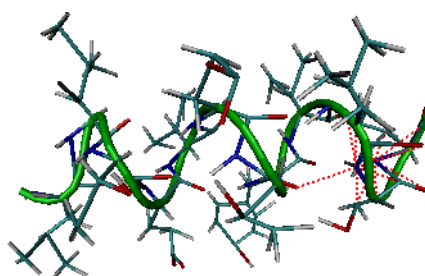
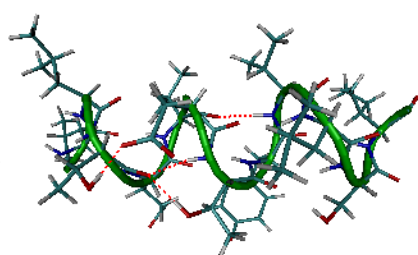
M1, 20 000 ps
300 K

0 ps

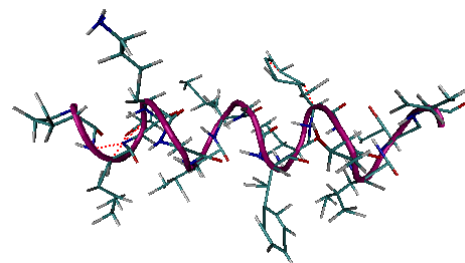
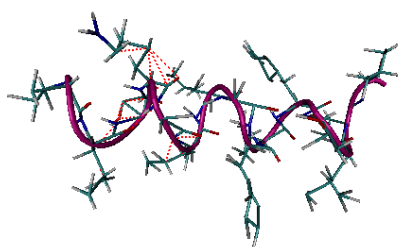
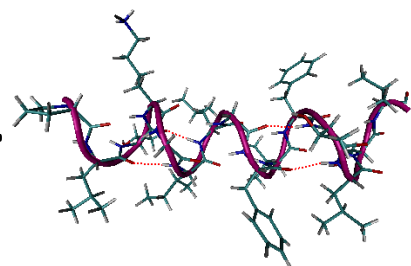
5 000 ps

10 000 ps

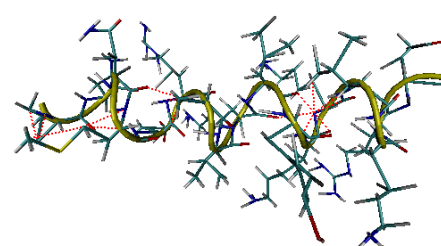
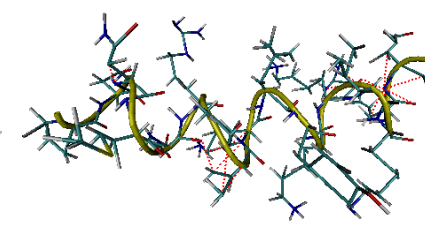
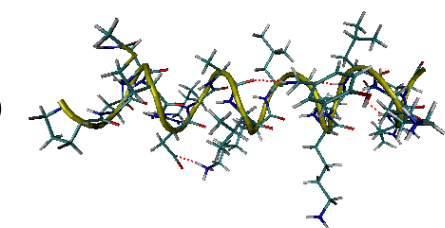
H1



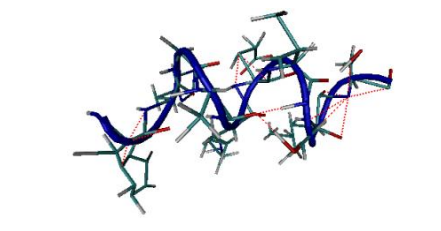
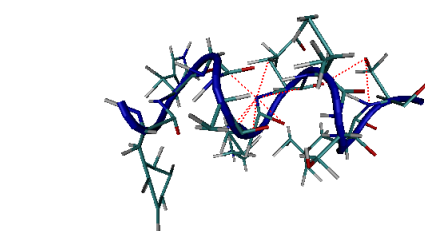
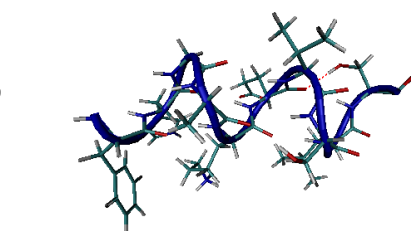
H4

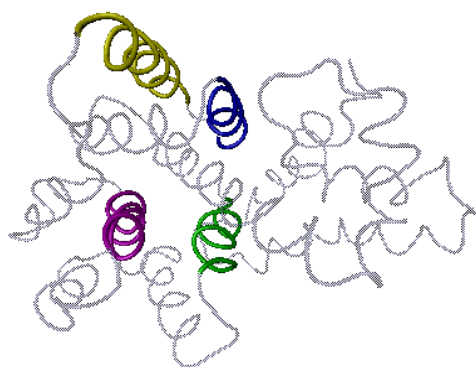


H6



H7





**M1, 20 000 ps
300 K**

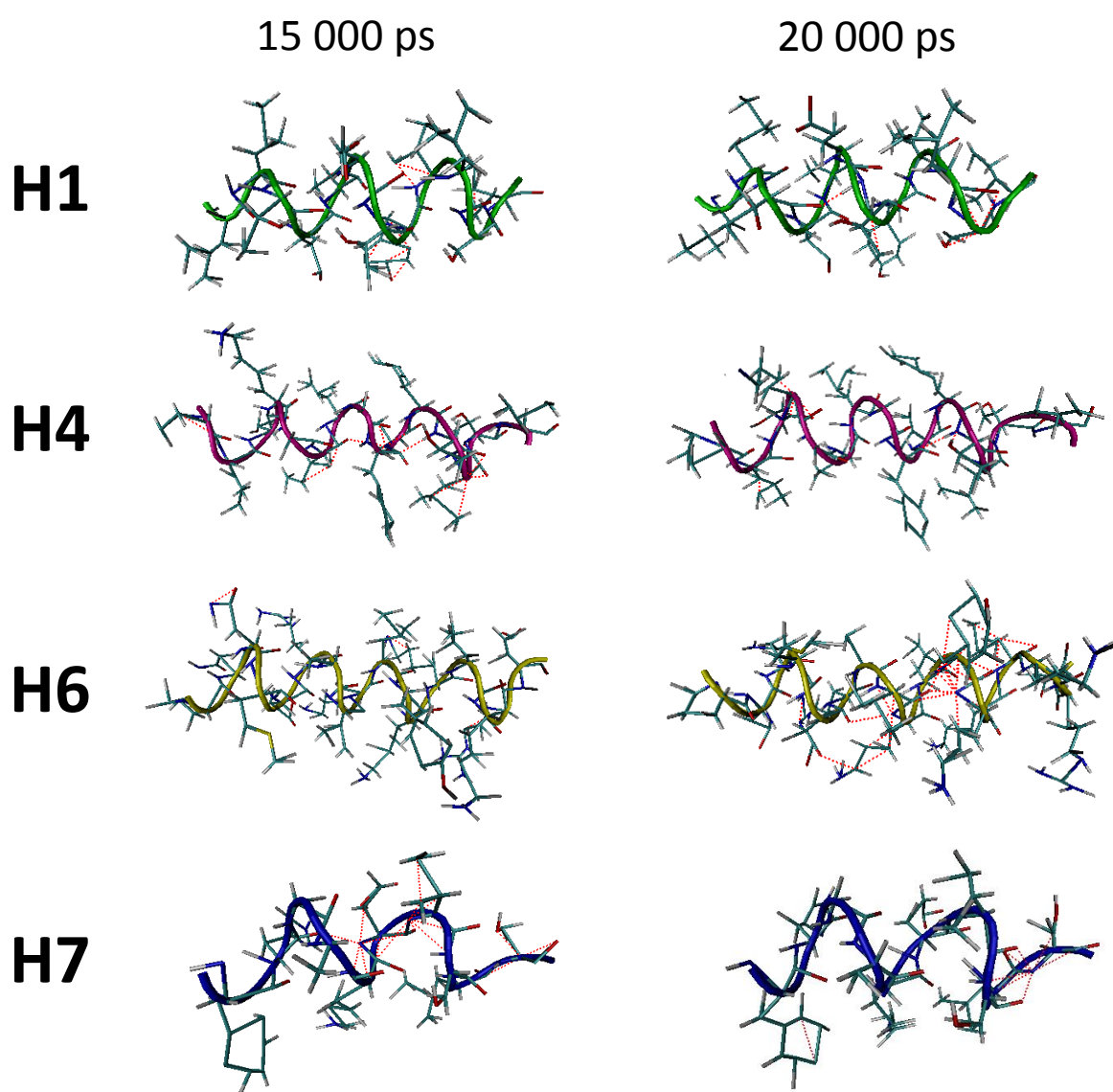
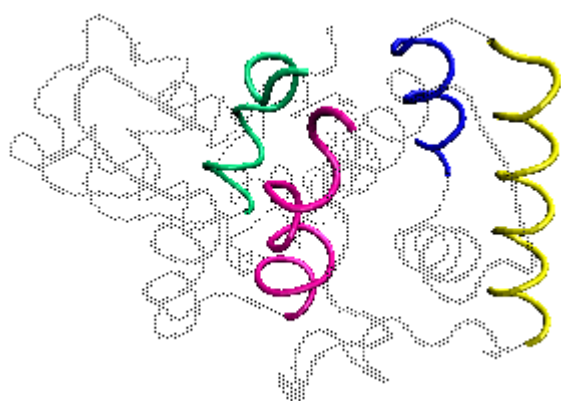


Figura VI.2.14. Imágenes de las hélices H1, H4, H6 y H7 tomadas a diferentes tiempos de simulación de la dinámica molecular a una temperatura de 300 K. Esta figura consta de dos secciones, en la primera se muestran los tiempos de simulación de 0, 5 000, 10 000 ps, mientras que en la segunda se muestran únicamente 15 000 y 20 000 ps. En la parte superior de la figura de cada sección se muestra la localización de cada hélice dentro de la estructura 3D de M1 obtenida al final de la simulación. En la parte inferior se muestran las respectivas hélices con sus respectivos puentes de hidrogeno (color rojo)



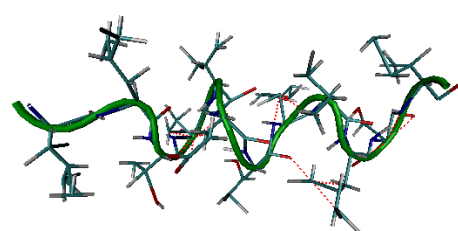
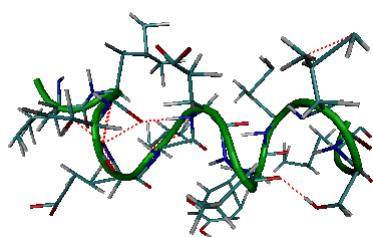
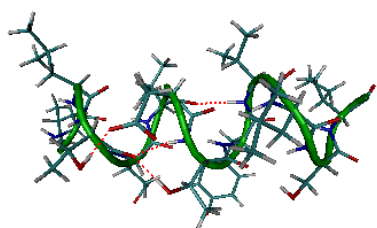
**M1, 20 000 ps
400 K**

0 ps

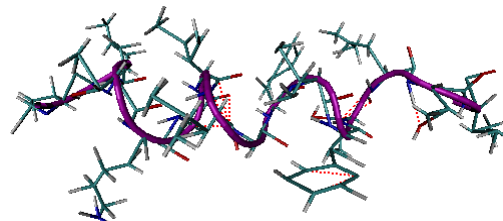
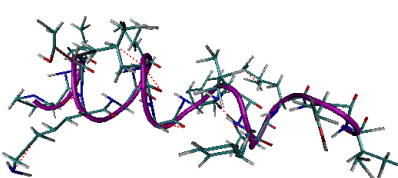
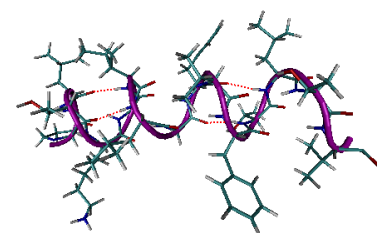
5 000 ps

10 000 ps

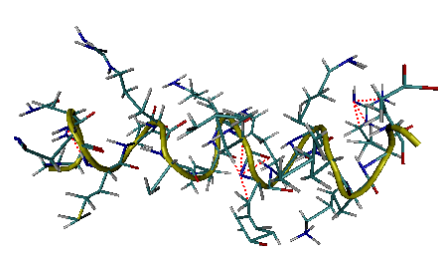
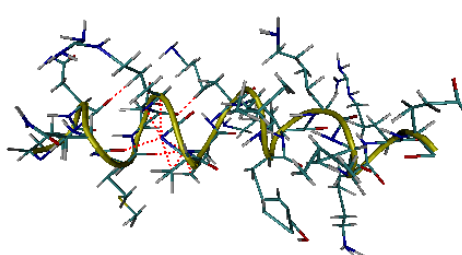
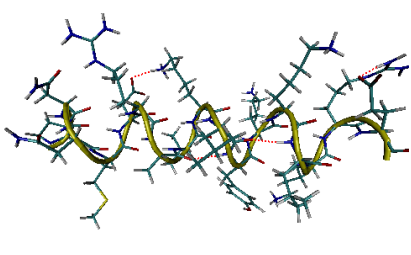
H1



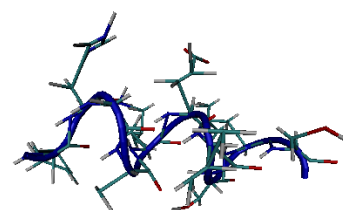
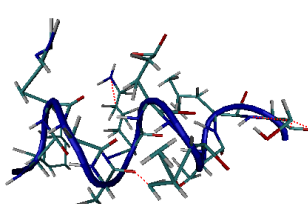
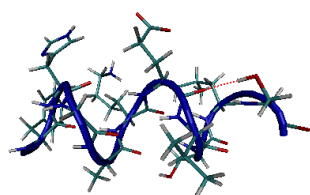
H4

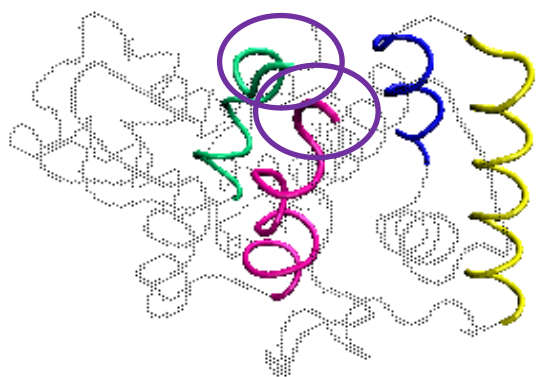


H6



H7



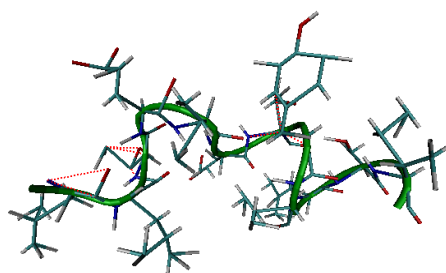
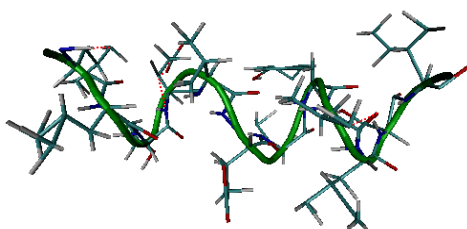


**M1, 20 000 ps
400 K**

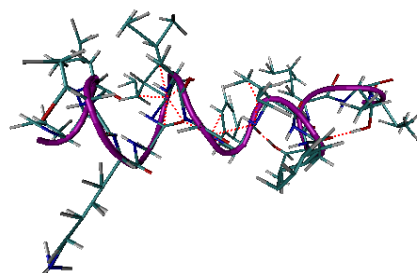
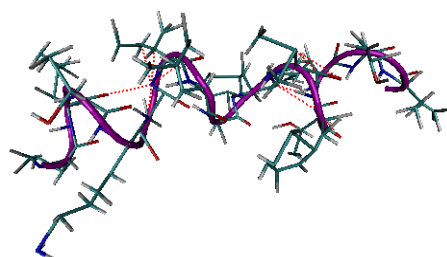
15 000 ps

20 000 ps

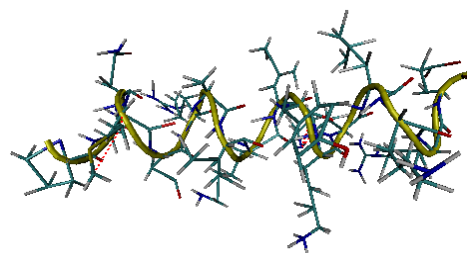
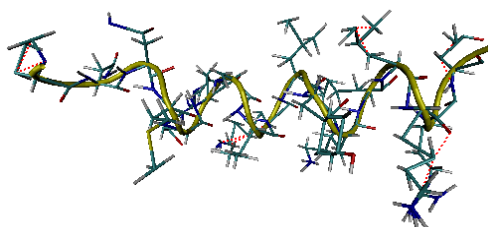
H1



H4



H6



H7

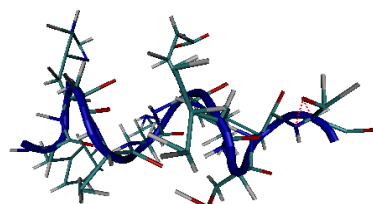
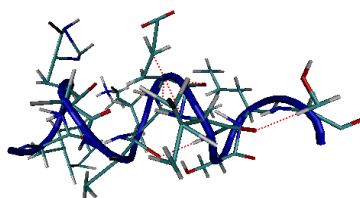
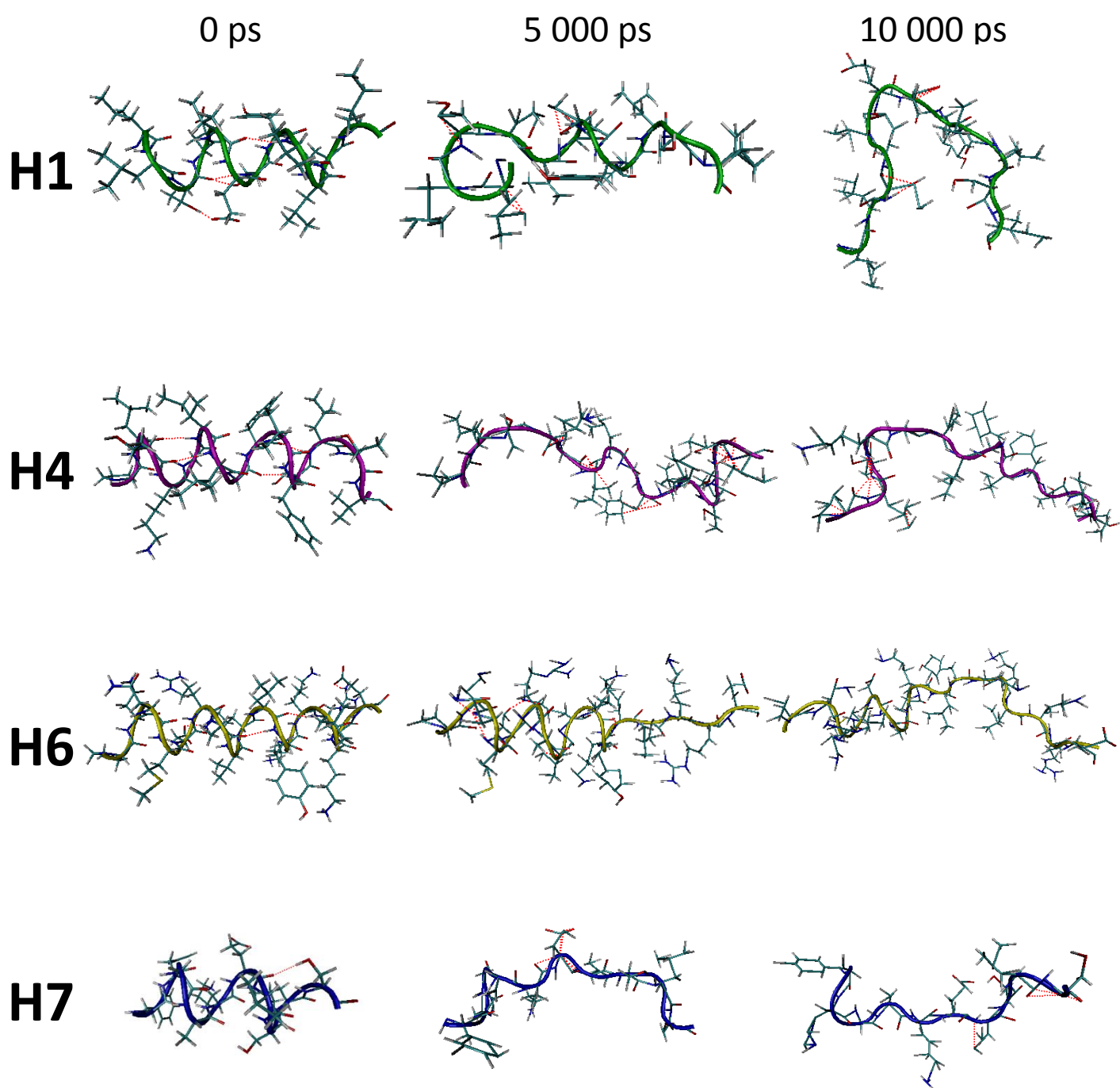
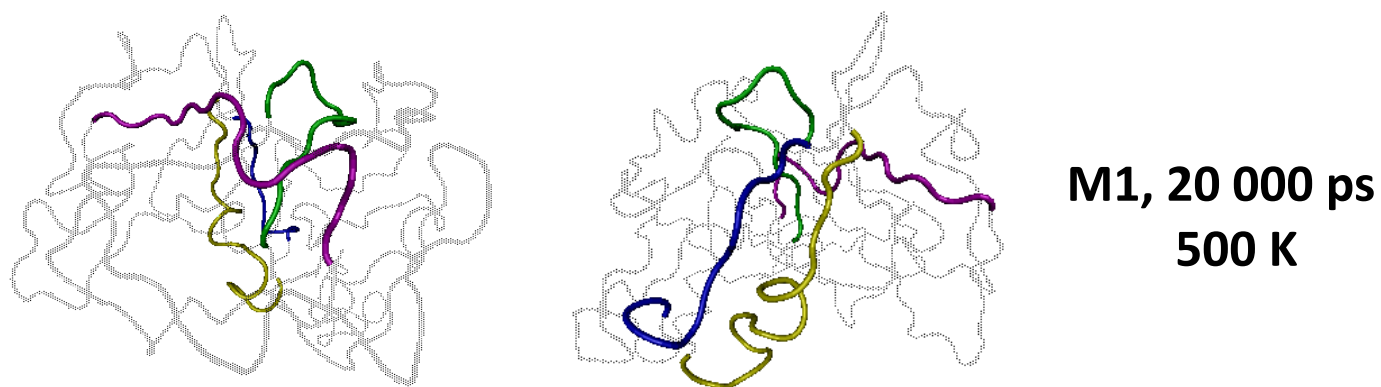


Figura VI.2.15. Imágenes de las hélices H1, H4, H6 y H7 tomadas a diferentes tiempos de la simulación por dinámica molecular a una temperatura de 400 K. esta figura consta de dos secciones, en la primera se muestran los tiempos de simulación de 0, 5 000, 10 000 ps, mientras que en la segunda se muestran únicamente 15 000 y 20 000 ps. En la parte superior de la figura de cada sección se muestra la localización de cada hélice dentro de la estructura 3D de M1 obtenida al final de la simulación. En la parte inferior se muestran las respectivas hélices con sus puentes de hidrogeno (color rojo). Los óvalos de color morado localizados en el modelo 3D de M1, representan las áreas de exposición al solvente de las H1 y H4.



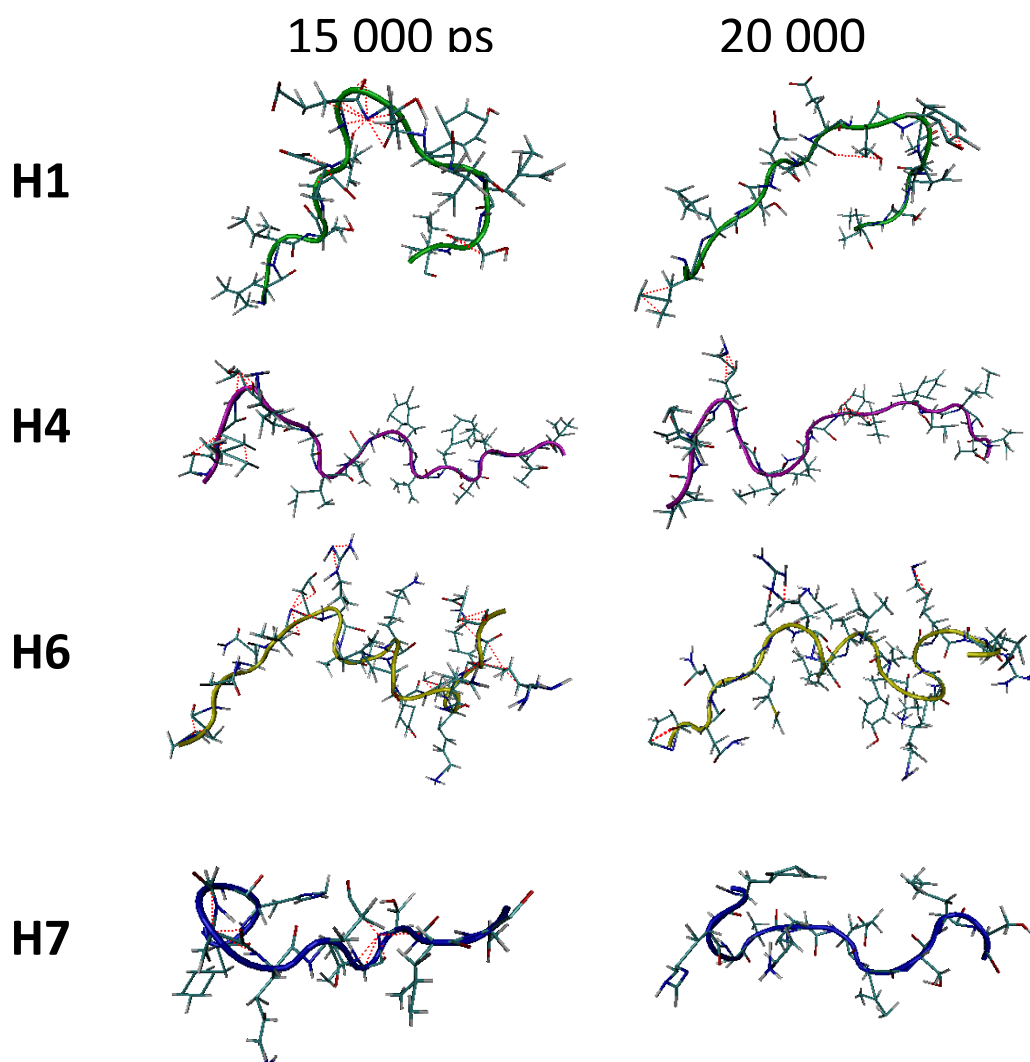
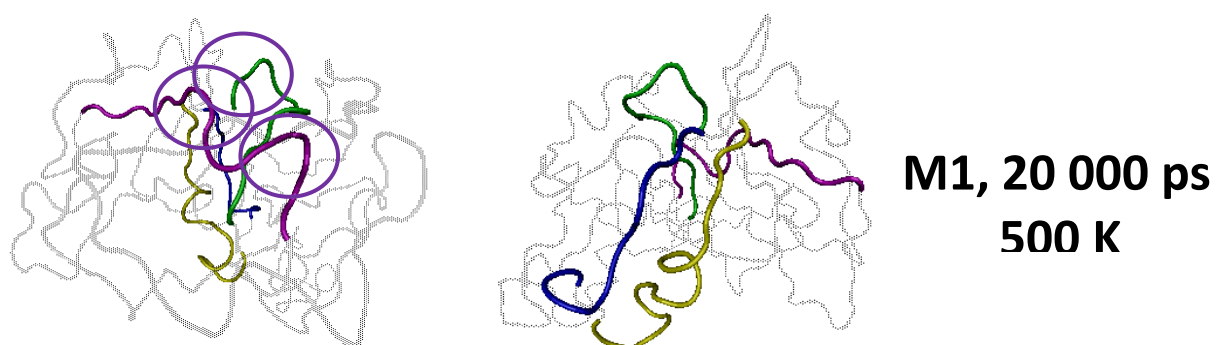
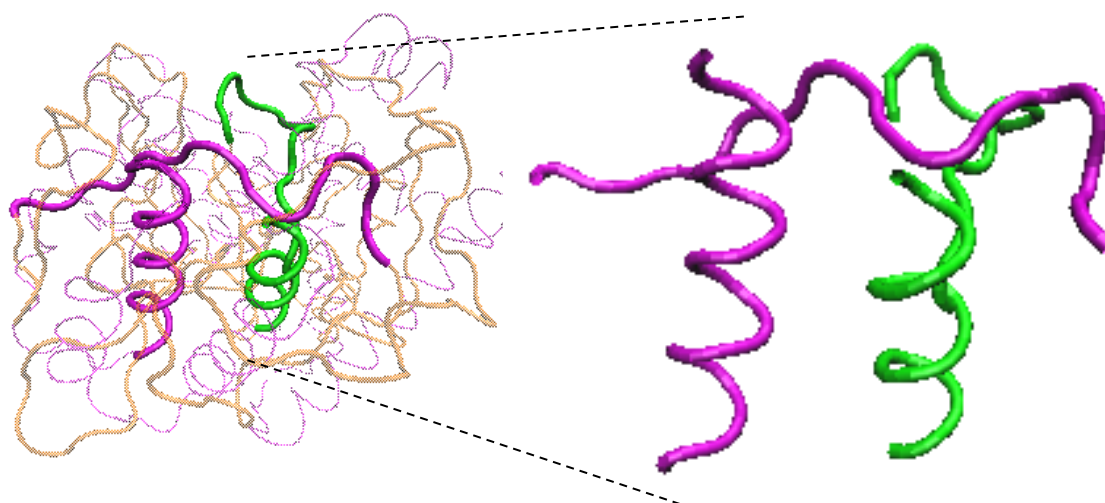
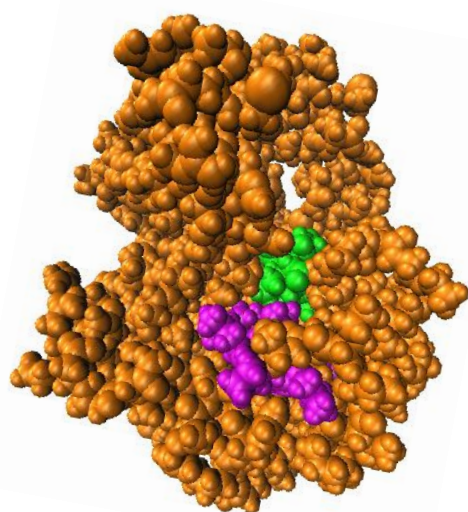
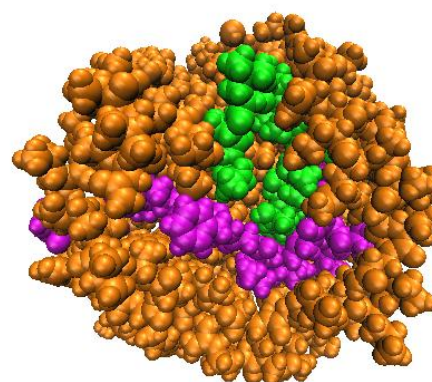


Figura VI.2.16. Imágenes de las hélices H1, H4, H6 y H7 tomadas a diferentes tiempos de la simulación por dinámica molecular a una temperatura de 500 K. Esta figura consta de dos secciones, en la primera se muestran los tiempos de simulación de 0, 5 000, 10 000 ps, mientras que en la segunda se muestran únicamente 15 000 y 20 000 ps. En la parte superior de la figura de cada sección se muestra la localización de cada hélice dentro de la estructura 3D de M1 obtenida al final de la simulación, vista desde la parte superior y lateral (de izquierda a derecha). En la parte inferior se muestran las respectivas hélices con sus respectivos puentes de hidrogeno (color rojo). Los óvalos de color morado localizados en el modelo 3D de M1, representan las áreas de exposición al solvente de las H1 y H4.

A**B**

0 ps



20 000 ps

Figura VI.2.17. Exposición al solvente de las hélices H1 y H4, 20 000 ps de simulación a una temperatura de 500 K. **A.** Superposición de las estructuras 3D de la M1 a 0 ps y la obtenida después de los 20 000 ps de simulación, resaltando a las hélices H1 (color verde) y H4 (color rosa). Las hélices estructuralmente formadas pertenecen a la estructura de 0 ps. Mientras que aquellas que se encuentran totalmente desestructuradas corresponden a la estructura de los 20 000 ps. **B.** Se muestra más a detalle la exposición al solvente que tienen las H1 (verde) y H4 (rosa).

VII.- RESUMEN DE RESULTADOS

VII.1.- *In vitro*

- A partir del segmento 7 del virus pandémico de la influenza A/H1N1/2009, se logró clonar el gen M1 en el vector de expresión pET19b-m
- El rendimiento de la proteína M1 fue muy aceptable (4.3 mg /300 ml de cultivo), cuando se utilizó la cepa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS
- La rápida y alta expresión de la proteína M1, repercute en su acumulación en el citoplasma del huésped, favoreciendo muy probablemente la formación de los cuerpos de inclusión
- Se purificó M1 hasta homogeneidad en condiciones desnaturalizantes.

VII.2.- *In silico*

- Se obtuvo el modelo tridimensional de la proteína M1, que fue expresada de manera recombinante en los estudios *in vitro*.
- La estructura tridimensional de M1 es muy estable cuando se somete a una simulación de dinámica molecular a temperaturas de 300 y 400 K y un tiempo de 20 000 ps, ya que presenta pocos cambios conformacionales.
- El desplegamiento de la proteína M1 se logró utilizando una temperatura de simulación de 500 K y la transición ocurrió en los primeros 5 000 ps de simulación. No se observó la presencia de intermediarios aparentes, por lo que se propone un mecanismo de desplegamiento de dos estados (nativo al desplegado) sin intermediarios detectables.



- Las H6 y H14 son las únicas estructuras secundarias de M1 que son muy estables durante los 20 000 ps de simulación, a una temperatura de 500 K.
- Con la simulación a 500 K se pudo evidenciar un posible mecanismo por el cual la H1 y la H4 se exponen al solvente y quedan accesibles para poder interaccionar con la membrana.

- La exposición al solvente de las H1 y H4 se origina en la zona basal (se caracteriza porque es donde se encuentra la región amino terminal) y se desplaza hacia la zona apical de la proteína M1 (ver flecha de color rojo de la figura VII.2.1.). Este hallazgo podría tener importantes implicaciones para explicar la interacción de M1 con las membranas celular del hospedero.

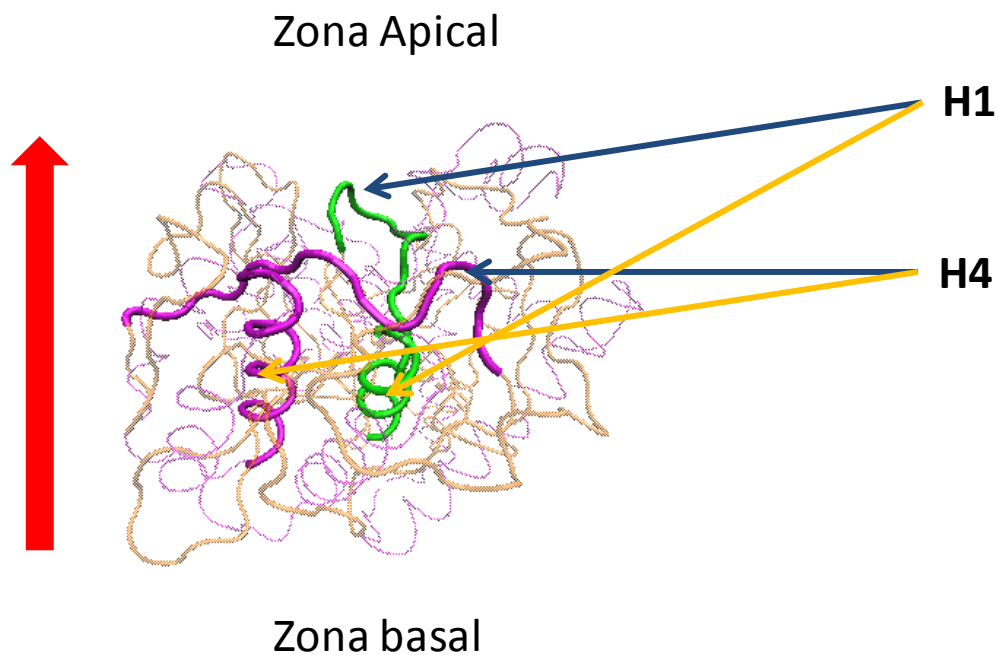


Figura VII.2.1. Exposición al solvente de las H1 y H4, después de una simulación a 500 K. la flecha de color rojo indica la dirección en la que se desplazan las estructuras secundarias para quedar accesibles al solvente; las flechas de color amarillo indican la posición de las estructuras secundarias dentro de la estructura nativa; las flechas de color azul indican la posición final que adquieren las H1 y H4 después de la dinámica a 500 K.

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1.-*In vitro*

Existen diversos reportes en la literatura acerca de la sobreexpresión de la proteína M1 en células de *E. coli* y de sus posterior purificación mediante diversos métodos cromatográficos. Particularmente la proteína M1 del virus de la influenza A/Puerto Rico/8/34 (RuigroK *et al.*, 2000, Noton *et al.*, 2007, Elster *et al.*, 1997). Se han logrado purificar tres formas de la proteína M1, completamente solubles: a) comprendida de los aminoácidos 1 – 162 (Harris, *et al.*, 2001), 1-164 (Baudin *et al.*, 2001); b) aminoácidos 165 – 252 (Baudin *et al.*, 2001); c) proteína completa (Arzt *et al.*, 2001), sin embargo en ningún trabajo previo se ha tratado de clonar y expresar el gen de la proteína M1 del virus pandémico de la influenza A/H1N1/2009/México que se presenta en este trabajo. De manera satisfactoria se logró clonar el gen M1 en el vector de expresión pET19b modificado. Así mismo se obtuvieron niveles de expresión adecuados; sin embargo aproximadamente un 95% de la proteína M1 recombinante se encontraba formando cuerpos de inclusión dentro de la célula huésped. Dichos cuerpos como bien se sabe son estructuras esféricas densas e insolubles que se forman cuando existe una sobreproducción y acumulación de una determinada proteína recombinante en el citoplasma y periplasma del microorganismo transformado (por lo general es *E. coli*) (Bowden *et al.*, 1991). Los cuerpos de inclusión están formados principalmente de proteínas que se encuentran en un estado parcialmente plegado, con estructuras secundarias parecidas a las estructuras de la proteína nativa. Además es importante recalcar que usualmente estos cuerpos de inclusión son altamente homogéneos.

Existen factores determinantes que dictan si una proteína se agrega o no, estos son: la secuencia de aminoácidos, el pH, la temperatura, la fuerza iónica, la concentración de proteína, la interacción con ligandos, ausencia de chaperonas moleculares.

Probablemente en nuestro caso la formación de los cuerpos de inclusión se vio favorecido gracias dos factores:

- 1) Debido a la naturaleza hidrofóbica de la proteína M1; además de que tiene también la propiedad de multimerizarse
- 2) Los 21 aminoácidos extras que tiene M1 en su extremo amino (de amino a carboxilo: 10 histidinas, 11 aminoácidos que tienen un sitio de corte que es

reconocido por la PPS). En algunos trabajos previos se han reportado que los aminoácidos extras a la secuencia de M1 (que podrían estar ocultos en su núcleo hidrofóbicos), vuelven a la proteína más insoluble y por lo tanto una mayor tendencia a la agregación (Watanabe *et al.*, 1996)

- 3) La temperatura, la concentración de sal así como el pH son factores que influyen en la solubilidad de M1 (Ruigrok *et al.*, 2000, Chalmers *et al.*, 1990, Strandberg *et al.*, 1991).

En nuestro trabajo se realizaron ensayos de sobre-expresión a tres diferentes temperaturas: 25, 30 y 37 °C y a tres diferentes concentraciones del agente inductor IPTG a 0.2, 0.5 y 1 mM. Además, para el proceso de extracción de la proteína de la célula productora, se utilizaron dos amortiguadores: Tris 20mM, a tres diferentes pH 7, 7.9 y 8; amortiguador MES 20 mM, a dos diferentes pH 4.5 y 6.5. En todos los amortiguadores se probaron concentraciones de NaCl que fueron desde los 100 mM hasta los 700 mM (datos no mostrados). Todas las modificaciones anteriores se realizaron con el propósito de obtener la mayor cantidad de proteína M1 en la fracción soluble. Sin embargo, estos intentos fueron infructuosos debido a que era mínima la cantidad de M1 que se encontraba en solución (tal vez menos del 5% de la expresión total de proteína). También se intentó purificar a M1 a partir de la fracción soluble, mediante una cromatografía de afinidad NiNTA, en condiciones nativas (datos no mostrados). Pero la M1 prácticamente no fue retenida en la columna de NiNTA. Para explicar la nula interacción entre resina NiNTA y las 10 histidinas del amino terminal de M1, se analizó la estructura cristalográfica reportada para M1 (aminoácidos del 1 al 162). En base a este análisis podemos proponer que el tracto de histidinas se esconde en el núcleo hidrofóbicos de M1 (tanto en forma monomérica como multimérica) y por lo tanto queda poco o nada accesible para interaccionar con la resina.

También se realizaron ensayos para solubilizar los cuerpos de inclusión (urea 4 M) y purificar a la proteína M1 a partir de ellos. Se purificó de manera satisfactoria bajo condiciones desnaturalizantes. Se realizaron varios intentos de replegamiento de la proteína M1, eliminando la urea gradualmente en columna de afinidad (NiNTA) o bien mediante diálisis. Sin embargo, no fue posible recuperar M1 plegada correctamente a juzgar por los espectros de DC (ver figura VI.1.15) en los que se aprecia un espectro de una proteína carente de los elementos de estructura secundaria característicos de M1 (Arzt *et al.*, 2001). Cabe señalar que las variaciones de las condiciones de cultivo y purificación de M1 incluyen a las reportadas previamente por Arzt, sin embargo todos

los ensayos de ese reporte se ha realizado con la M1 de la cepa A/Puerto Rico/8/34 y en todos ellos M1 siempre se ha mantenido soluble (Ruigrok *et al.*, 2000, Noton *et al.*, 2007, Elster *et al.*, 1997). Por lo tanto es muy probable que los 13 aminoácidos en los que difieren las dos secuencias de M1 (A/H1N1/2009/México y A/Puerto Rico/8/34), sean las responsables de la insolubilidad observada en M1 (A/H1N1/2009/México de nuestro trabajo (ver el alineamiento múltiple de la figura VIII.1.1). De estos 13 aa resaltan las posiciones 214 y 231 de la secuencia de A/H1N1/2009/México presenta residuos polares con carga (Glutamina y Asparagina, respectivamente), mientras que la secuencia A/Puerto Rico/8/34 presenta residuos cargados positiva y negativamente (Histidina y Acido aspártico respectivamente) en las mismas posiciones. Por lo que una posible propuesta para futuras investigaciones es realizar los ensayos de mutagénesis dirigida sobre esas dos posiciones y evaluar el posible aumento de solubilidad de M1 A/H1N1/2009/México.

						
	5	15	25	35	45	55
A/PR/8/34	MSLLTEVETY	VLSIIPSGPL	KAEIAQRLED	VFAGKNTDLE	VLMEWLKTRP	ILSPLTKGIL
A/H1N1/2009	MSLLTEVETY	VLSIIPSGPL	KAEIAQRLES	VFAGKNTDLE	ALMEWLKTRP	ILSPLTKGIL
Comparación	*****	*****	*****	*****	*****	*****
						
	65	75	85	95	105	115
A/PR/8/34	GFVFTLTVP	ERGLQRRRFV	QNALNGNGDP	NNMDKAVKLY	RKLKREITFH	GAKEISLSYS
A/H1N1/2009	GFVFTLTVP	ERGLQRRRFV	QNALNGNGDP	NNMDRAVKLY	KKLKREITFH	GAKEVLSYS
Comparación	*****	*****	*****	***:*****	:*****	***:*****
						
	125	135	145	155	165	175
A/PR/8/34	AGALASCMGL	IYNRMGAVTT	EVAFGLVCAT	CEQIADSQHR	SHRQMVTTTN	PLIRHENRMV
A/H1N1/2009	TGALASCMGL	IYNRMGTVTT	EAAFGGLVCAT	CEQIADSQHR	SHRQMATTTN	PLIRHENRMV
Comparación	:*****	*****:***	*.*****	*****	*****:***	*****
						
	185	195	205	215	225	235
A/PR/8/34	LASTTAKAME	QMAGSSEQAA	EAMEVASQAR	QMVQAMRTIG	THPSSSAGLK	NDLLENLQAY
A/H1N1/2009	LASTTAKAME	QMAGSSEQAA	EAMEVANQTR	QMVHAMRTIG	THPSSSAGLK	DDLLENLQAY
Comparación	*****	*****	*****:*:	***:*****	*****	:*****
						
	245					
A/PR/8/34	QKRMGVQMQR	FK				
A/H1N1/2009	QKRMGVQMQR	FK				
Comparación	*****	**				

Figura VIII.1.1. Comparación de aminoácidos entre la proteína M1 de dos diferentes cepas. En la línea 1 se muestra a la M1 de la cepa A/PR/8/34; en la segunda línea se representa a la cepa A/H1N1/2009/México. En rojo se resaltan los aminoácidos que son diferentes con respecto a la A/PR/8/34

VIII.2.- *In silico*

En la actualidad los estudios computacionales de simulaciones de dinámica molecular han servido de gran apoyo al área biológica para entender la dinámica de algunas macromoléculas como tal es el caso de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, sin embargo, en el campo de las proteínas, para analizar su estabilidad, se utilizan estrategias en las que se analiza su dinámica molecular a distintas temperaturas; esto permite explorar las posibles conformaciones que la proteína de interés podría adoptar en diversas condiciones fisicoquímicas (Day *et al.*, 2003, Olufsen *et al.*, 2007, Kundu *et al.*, 2008, Jonsson *et al.*, 2009).

Aunque los estudios computacionales han tenido gran impacto en el área biológica, especialmente en el estudio de la dinámica y estabilidad de proteínas, actualmente no se cuenta con ningún trabajo que evalúe la dinámica de la proteína M1 del virus de la influenza a pesar de que los estudios *in vitro* que se tienen sobre ella datan de principios de los años 80. Tampoco existe ningún trabajo de algún miembro de la familia *Orthomyxoviridae* (incluye 5 miembros: influenza A, influenza B, Influenza C, isavirus, thogotovirus) que nos pueda ayudar a entender la estabilidad de M1 y por lo tanto no hay suficiente información para comparar nuestros resultados obtenidos con otros. Es importante indicar que somos pioneros en el estudio de la estabilidad de la proteína M1.

Iniciando la discusión respecto a los resultados del gráfico de RMSD donde pudimos observar que el desplazamiento de los carbonos- α (C- α), de los respectivos aminoácidos que componen a M1, se incrementa conforme se incrementa la temperatura. Las simulaciones a una temperatura elevada, en nuestro caso también mostraron largas fluctuaciones de la posición de los C- α , indicando que hay un incremento en su movilidad (ver figura VI.2.6).

En el gráfico de RMSD una sola fase es visible en la simulación de 500 K la cual alcanza un equilibrio (donde ya no existen cambios aparentemente significativos en la estructura de M1) después de los 5 000 ps, con un valor de 14 °Å y se mantiene hasta el final de la simulación. De acuerdo a estos resultados podemos proponer que M1 se despliega en una reacción de dos estados (N $\longrightarrow$ D) donde la transición se lleva a cabo de los 0 a los 5 000 ps de simulación sin la presencia de intermediarios detectables con una señal de 14 °Å, mantiene una diferencia de aproximadamente 10 °Å con respecto a la de 300 K y de acuerdo a la bibliografía para que una proteína

se considere en un estado desplegado, tiene que mantener una diferencia de 5 °Å en valor de RMSD con respecto al RMSD de la estructura control. Por lo tanto podemos proponer que nuestra proteína se encuentra en un estado desplegado después de los 5 000 ps, aunque hay que resaltar que la desviación que experimenta el modelo de M1 durante la simulación a las diferentes temperaturas de 300, 400 y 500 K no se distribuye de manera uniforme a lo largo de su secuencia de aminoácidos (ver gráfico de RMSF de la figura VI.2.6). Podemos destacar un alto grado de fluctuación en aquellos aminoácidos que se encuentran en loops y turns y esas fluctuaciones son muy evidentes a las tres temperaturas de simulación utilizadas en este trabajo. Es importante resaltar que el aa R178, localizado en el loop que conecta la H11 y H12, se encuentra en constante movimiento desde la simulación a los 300 K (con un valor de 2.6 °Å), aunque es más evidente esa fluctuación cuando calentamos a 400 K, donde la proteína alcanza un valor de 10 °Å y mucho más evidente cuando se calienta a 500 K, donde la proteína alcanza un máximo vibracional con un valor de 22 °Å. Sin embargo es muy interesante destacar que los aminoácidos E40, P70, L124, E141 y L234 se mantienen muy rígidos en las simulaciones de 300, 400 y 500 K. Muy probablemente esta rigidez se la estén confiriendo las interacciones que tienen estos con sus vecinos. Estos aa rígidos se encuentran formando parte de estructuras secundarias muy estables: E40 (H3), P90 (H6), L124 (H8), E141 (H9) y L234 (H14). Esto se puede sustentar al analizar los mapas de contacto pertenecientes a las estructuras finales de las simulaciones de 300 v/s 400 K y de 300 v/s 500 K. donde observamos que los contactos disminuyen conforme se aumenta la temperatura (ver figura XI.1.1). Sin embargo es de destacar que la pérdida de contactos intermoleculares en M1, no necesariamente se ve reflejado en su tamaño, ya que aunque se caliente la proteína a 400 (adquiere un tamaño de 19.5 °Å) o 500 K (adquiere un tamaño de 18.5 °Å) siempre se mantiene en un tamaño cercano a 19 °Å referente al de 300 K. Aún más interesante es la compactación de M1 en aproximadamente 0.5 °Å cuando se calienta a 500 K, con respecto a la de 300 K.

No obstante, cuando M1 fue calentada a 400 y 500 K mostró un grado de compactación muy similar en ambas temperaturas (siendo una diferencia de 1 °Å). Estas mostraron diferente área de exposición al solvente, ya que a mayor temperatura hay una mayor área de exposición al solvente (300 < 400 < 500 K), ver gráfico de SASA. Este efecto se podría explicar por el hecho de la proteína M1 a una temperatura elevada (tal es el caso de 400 y 500 K) se aumenta la cinética de los átomos, así como la perdida gradualmente de contacto entre ellos y por lo tanto se

promueve la exposición de estructuras que originalmente estaban ocultas al solvente (ver figura VI.2.17), sin la necesidad de expandirse totalmente la proteína. Por lo tanto la red de puentes de hidrógeno tuvo que reorganizarse, por ejemplo a 500 K la proteína pierde 26 puentes con respecto a la de 300 K; mientras que la de 400 K tiende a mantener un patrón muy parecido al de 300 K, esto puede verse claramente en el mantenimiento y conservación de sus estructuras secundarias (ver figura VI.2.11). Como la simulación de M1 a 500 K es la que nos puede dar más información sobre su comportamiento, entonces podemos analizar y destacar que aunque M1 perdió 26 puentes de hidrogeno con respecto a la de 300 K, también ganó 29 puentes salinos con respecto a la de 300 K (45 puentes salinos). Este aumento en el número de puentes salinos a 500 K puede ser la razón de que M1 sea más compacta y estable que la de 300 K al final de los 20 000 ps de simulación, ya que aunque pierde enlaces débiles (los puentes de hidrógeno: aportan una energía de enlace de 8 – 21 KJ/mol), este efecto se compensa con la ganancia de 29 enlaces ligeramente fuertes (los puentes salinos: dependen de la distancia, pero generalmente aportan una energía de enlace de 42 KJ/mol) (Lounnas *et al.*, 1997).

De manera particular se analizó la estabilidad de 4 de las estructuras secundarias de M1 que están involucradas en la función que esta desempeña *in vivo* (estas funciones ya se mencionaron en la introducción). Dichas estructuras son las siguientes hélices H1, H4, H6 y H7. Durante su simulación a 300 y 400 K, mostraron que son muy estables a lo largo de los 20 000 ps de simulación, salvo por la H1 que a una temperatura de 400 K perdió ligeramente su estructura. Sin embargo donde se observaron grandes cambios en la estructura y estabilidad de las hélices, fue a los 500 K. Se pudo notar que después de los 5 000 ps casi todas las hélices pierden gradualmente su estructura, salvo por la H6 la cual tiende a mantener al menos $\frac{1}{4}$ de su estructura hasta el final de la simulación. Por lo tanto podemos deducir que la H6 es la estructura más estable de las que fueron analizadas y muy probablemente esta resistencia a la temperatura se deba a la importancia que tiene esta región de la proteína durante el ciclo biológico del virus de la influenza, en procesos como son: regulación de la transcripción, regulación de la replicación viral y la exportación del vRNP del núcleo de la célula hospedera).

Se puede realizar una relación de estabilidad estructural de las hélices analizadas cuando se utiliza la temperatura como agente desestabilizante, quedando de la siguiente manera:

Más estable **H6 > H1 > H7 > H4** Menos estable

Por otro lado, si bien las H1, H4 y H7 se insertan en la membrana tal y como lo reportan en la literatura (mediante experimentos *in vitro*), y conociendo la estructura cristalográfica de M1; es aún difícil de entender como H1 y H4 interaccionan con la membrana, ya que se encuentran en el núcleo hidrofóbicos de M1 nativa y por tal motivo se encuentran nada o poco accesibles al solvente. Consiguientemente en este trabajo se utilizaron elevadas temperaturas (400 y 500 K) para desestabilizar a M1 y en la dinámica de 500 K encontramos un dato muy interesante que tal vez nos ayude a entender la dinámica de H1 y H4. Notamos que lenta pero gradualmente se exponen al solvente las regiones que corresponden a la H1 y H4 (muestra un patrón de exposición más notorio). Esta exposición se da de la zona basal a la apical de la proteína M1 tal como se observa en la figura VI.2.17.

IX.- CONCLUSIONES

IX.1.- *In vitro*

El gen de M1 del virus de la influenza A /H1N1/2009 que se afectó a gran parte de la población mexicana en el año del 2009, se logró expresar de manera satisfactoria en células de *E. coli*, sin embargo, la alta expresión y la hidrofobicidad de la proteína M1 siempre condujeron que esta se dirigiera a la formación de cuerpos de inclusión. M1 solubilizada de los cuerpos de inclusión nunca adopto su conformación nativa, al utilizar los métodos tradicionales de replegamiento.

Por otro lado, muy probablemente los 13 aminoácidos que tiene de diferentes la proteína M1 de este trabajo con respecto a la forma soluble reportada de la cepa A/Puerto Rico/8/34, influyan en su insolubilidad.

IX.2.- *In silico*

El modelo tridimensional completo construido para la proteína M1, se desplego de manera satisfactoria en una simulación de la dinámica molecular a una temperatura de 500 K y un tiempo simulación de 20 000 ps. Se encontró que el desplegamiento de la proteína M1 se lleva a cabo en dos estado (del nativo al desplegado) sin la presencia de intermediarios detectables. Además, a esta temperatura de simulación se puede constatar que la H6 es una de las dos estructuras (además de la H14) que mantienen estructura secundaria remanente.

De acuerdo a la dinámica observada a 500 K, también se propuso un posible mecanismo por el cual, las H4 y H1 de M1 se exponen al solvente para que muy probablemente se favorezca la interacción con la membrana viral

IX.3.- *In vitro e in silico*

Desgraciadamente no se pudieron correlacionar los resultados obtenidos *in silico* con los obtenidos *in vitro*, debido que no se pudo obtener la proteína M1 en su forma nativa y soluble, para poder realizarle los respectivos ensayos de deplegamiento.

X.- PERSPECTIVAS

X.1.- Estudios *in vitro*

- Se propone transferir el gen M1 del vector de expresión pET19b a un vector que carezca de secuencias que codifiquen para tractos (por ejemplo histidinas, o alguna proteína recombinante).
- Se propone seguir probando y modificando las condiciones de expresión de la proteína M1 que han sido reportadas para la proteína M1 A/PR/8/34.
- Se sugiere utilizar otro sistema de expresión de proteínas, por ejemplo utilizar la cepa de *E. coli* “Artic Express”, esta cepa tiene la ventaja de que permite la inducción y expresión de proteínas recombinantes a una temperatura cercana a los 13 °C y por lo tanto la expresión de proteínas se lleva a cabo a una velocidad mucho más lenta, también se aumenta la calidad del plegado, así como la disminución en la cantidad de proteína expresada, con respecto lo que lo llevan a cabo normalmente las cepas de *E. coli* BL21 (DE3)pLysS y la de Rosetta – gammi.
- En lo que respecta a la proteína M1 que se obtiene bajo condiciones desnaturalizantes, se sugiere someterla a un proceso de plegamiento, utilizando chaperonas.

X.2.- Estudios *in silico*

- Se propone analizar a detalle las interacciones atómicas que favorecen y mantienen la estructura de la H6, aun cuando esta se encuentre a temperaturas elevadas, mayores a 500 K.
- Se sugiere realizar una simulación de la proteína M1 con una membrana de DPPC, a una temperatura de 500 K, esto con el objeto de comprobar si es que existe una interacción entre las H1 y H4 (que se exponen al solvente) con la membrana de fosfolípidos.

XI.- APENDICE A

XI.1.- Figuras adicionales

XI.1.1.- Mapas de contacto de las estructuras finales de la simulación

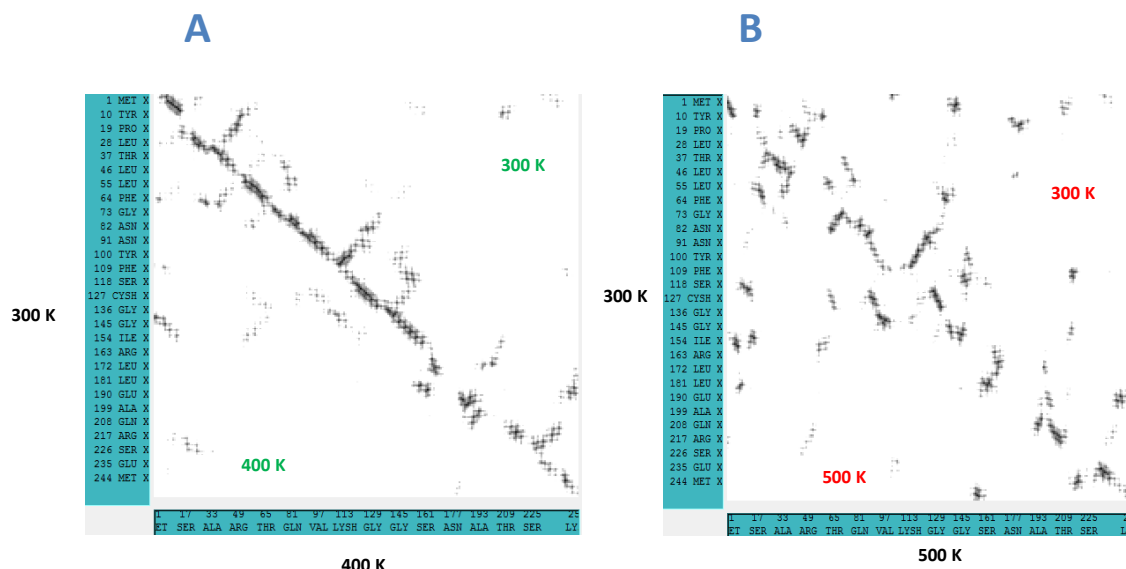


Figura XI.1.1. Mapas de contacto de las estructuras obtenidas al final de los 20 000 ps de simulación. En el panel A se muestra la comparación entre los contactos que se mantienen de las estructuras de M1 obtenidas a 300 K (eje de las “y”, los contactos a esta temperatura se representan en la parte superior derecha de este panel) con la de 400 K (eje de las “x”, los contactos a esta temperatura se muestran en la parte inferior izquierda de este panel). En el panel B se muestra la comparación entre los contactos que se conservan entre las estructuras de M1, obtenidas a 300 K (eje de las “y”, los contactos a esta temperatura se representan en la parte superior derecha de este panel) con la de 500 K (eje de las “x”, los contactos a esta temperatura se muestran en la parte inferior izquierda de este panel).

XII.- APENDICE B

XII.1.-Soluciones y Reactivos

XII.1.1.-Medios de cultivo

- LB (Luria – Bertani): (Sambrook et. al, 2001)
 - 0.5 % (w/v) de extracto de levadura
 - 1 % (w/v) de bacto-triptona
 - 1 % de NaCl
- 2XYT:
 - 1.6 % de triptona
 - 1 % de extracto de levadura
 - 0.5 % de NaCl
- Agar LB:
 - Medio de cultivo LB
 - 1.5 % (w/v) de agar bacteriológico

XII.1.2.- Antibióticos

- Kanamicina: Se utilizó a una concentración de 50 µg/ml (solución acuosa)
- Ampicilina: Se utilizó a una concentración de 100 µg/ml (solución acuosa)

XII.1.3.- Amortiguadores:

- **Amortiguador de carga 6X:**
 - 0.25 % de Azul de bromofenol
 - 40 % (w/v) de sacarosa
- **TAE (Tris – Acetato – EDTA, 50X):**
 - 242 g/l de Tris base
 - 57.1 ml/l de ácido acético glacial
 - 18.6 g/l de EDTA
- **Amortiguador de resuspensión, pH 7.9:**
 - 50 mM de Tris –HCl
 - 5 mM de EDTA

- 250 mM de NaCl
- 0.1 mM de PMSF
- 1 mM de DTT
- 0.5 % de Tritón X-100
- **Amortiguador de lavado, pH 7.9:**
 - 4 M de urea
 - 20 mM de Tris-HCl
 - 250 mM de NaCl
 - 20 mM de imidazol
- **Amortiguador de elución, pH 7.9:**
 - 4 M de urea
 - 20 mM de Tris-HCl
 - 250 mM de NaCl
 - 250 mM de imidazol

XII.1.4.- Soluciones:

- Soluciones de lisis alcalina (Sambrook, et. al. 2001):
 - Solución I:
 - 50 mM de glucosa
 - 25 mM de Tris – HCl (pH 8.0)
 - 10 mM de EDTA (pH 8.0)
 - Solución II:
 - 0.2 N NaOH
 - 1 % (w/v) de SDS
 - Solución III (volumen final 100 ml):
 - 5 M de acetato de potasio (60.0 ml)
 - Ácido acético glacial (11.5 ml)
 - Agua (28.5 ml)
- Solución teñidora de azul de Coomassie (para un volumen de 100 ml):
 - Disolver 0.25 g de azul brillante de Coomassie R-250 en 90 ml de la solución 1:1 (v/v) de Metanol – H₂O y finalmente se agregan 10 ml de ácido acético glacial

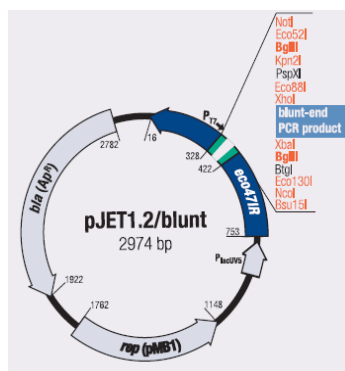
- Solución desteñidora de geles de SDS-PAGE:
 - 7.5 % (v/v) de ácido acético
 - 10 % (v/v) de etanol

XII.2.- Células de *E. coli*:

- DH5- α : cepa utilizada para realizar las subclonaciones del gen M1
- BL21 (DE3) pLysS: Cepa utilizada para la expresión de la proteína M1 recombinante
- Rosetta gami (DE3) Cepa utilizada para la expresión de la proteína M1 recombinante

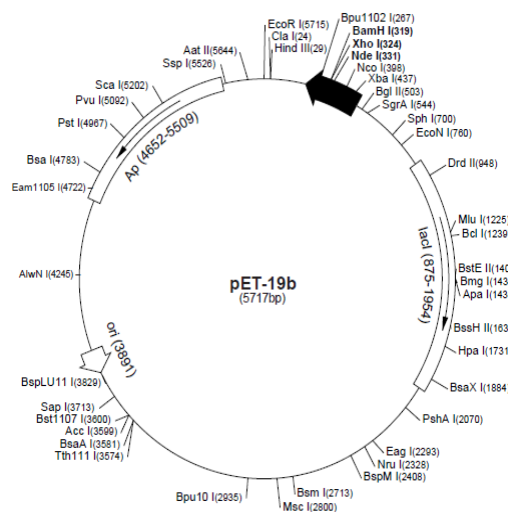
XII.3.- Vectores:

- pIVE-LIC-His_cHalo: Se recalca que no se tiene un mapa de este vector. En este vector se encuentra clonado el segmento 7 del virus de la influenza. De acuerdo a las especificaciones dadas por el Instituto Craig Venter, este vector cuenta con dos promotores: promotor T7 y SP6. Por otro lado en el extremo 5' de donde fue clonado el segmento 7 hay una secuencia que codifica para seis histidinas; mientras que en su extremo 3', se encuentra una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína Halo. Además este vector tiene el gen que codifica para la β -lactamasa que le confiere resistencia a ampicilina
- **pJET1.2**: Vector utilizado para subclonar el gen de M1 el cual fue amplificado por una reacción de PCR. Este vector consta de 2974 bp y se encuentra pre-abierto entre el nucleótido 371 y 372 lo que nos permite clonar fragmentos de DNA con extremos romos entre dichos sitios. Este vector tiene la ventaja de que nos permite seleccionar únicamente a aquellas clonas positivas, ya que si no se inserta ningún fragmento entre los sitios ya mencionados con anticipación, entonces el vector se circulariza y se completa el marco de lectura del gen letal *eco47IR* y por efecto las bacterias que hayan tomado este vector mueren. El mapa del vector se muestra en la siguiente figura, así como las especificaciones de su contenido:



Elemento	Función	Posición
Rep (pMB1)	Replicón (rep) del plásmido pMB1, el cual es responsable de la replicación de pJET1.2	1762 – 1148
<i>bla</i> (Ap ^R)	Gen que codifica para la β -lactamasa, lo cual le confiere resistencia a ampicilina	2782 – 1922
<i>eco47IR</i>	Gen letal que permite la selección positiva de las transformantes	753 – 16
Promotor T7	Promotor de la ARN polimerasa del fago T7	305 – 324
Zona de multiclonaje	Inserción del fragmento a clonar	422 – 328

- **pET19b (modificado):** Este es un vector de expresión que cuenta con todo lo necesario para permitir la clonación del gen M1 y posteriormente, dentro de una cepa de *E. coli*, permitir la expresión de la proteína M1. El mapa del vector se muestra a continuación, así sus características distintivas:



Elemento	Función	Posición
Promotor T7	Promotor de la ARN polimerasa del fago T7	472 – 488
CATCATCATCATCAT CATCATCATCATCAC	Secuencia que codifica para un tracto de 10 histidinas	366 – 395
Zona de multiclonaje	Insertión del fragmento a clonar	319 – 335
Ori pBR322	Origen de replicación	3891
<i>lacI</i>	Gen que codifica para el represor I	875 – 1954
<i>bla</i> (Ap ^R)	Gen que codifica para la β -lactamasa, lo cual le confiere resistencia a ampicilina	4652 – 5509

XII.4.- Enzimas

- **Fast Digest Bgl II:** Enzima de restricción de la casa comercial Fermentas; con numero de catálogo ER0081
- **Fast Digest Nde I:** Enzima de restricción de la casa comercial Fermentas; con numero de catálogo FD0584

- **Fast Digest Xho I:** Enzima de restricción de la casa comercial Fermentas; con numero de catálogo FD0694
- **Fast Digest Xba I:** Enzima de restricción de la casa comercial Fermentas; con numero de catálogo FD0688
- **T4 DNA ligasa:** De la casa comercial Fermentas; con numero de catálogo EL0011

XII.5.- Kits moleculares utilizados

- **Amplificasa EA250:** Utilizado para realizar la reacción de PCR. Es de la casa comercial BioTecMol. Los componentes de este Kit son:
 - **Amortiguador 10X** (KCl 500 mM, Tris=HCl)
 - **Cloruro de Magnesio 20X** (30 mM)
 - **Amplificasa**
- **QIAprep Spin Miniprep Kit (250):** Utilizado para purificar plásmidos recombinantes. Es de la casa comercial Qiagen y el número de catálogo es 27106.
- **QIAquick Gel Extraction Kit (50):** Utilizado para purificar fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa. Es de la casa comercial Qiagen y el número de catálogo es 28704

XIII.- BIBLIOGRAFIA

- Ali A., Avalos R., Ponimaskin E., Nayak D. 2000. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *Journal of Virology*. 74, 18 : 8709 – 8719
- Arzt S., Baudin F., Barge A., Timmins P., Burmeister W., Ruigrok R., 2001. Combined results from solution studies on intact influenza virus m1 protein and from a new crystal form of its n-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Virology*. 279, 439 – 446
- Baudin F., Petit I., Weissenhorn W., Ruigrok R., 2001. *In vitro* dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology*. 281, 102 – 108
- Bouvier N. and Palese P. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 26S, D49-D53
- Bowden G., Paredes A., Georgiou G., 1991. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 9, 725 – 730
- Bui M., Will E., Helenius A., Whittaker G. 2000. Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The Journal of Virology*. 74, 1781 – 1786
- Compans R. and Chopping P. 1975. Reproduction of myxoviruses. *Comprehensive Virology*. Vol. IV, 179 – 252
- Cras J. and Palese P. 2003. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borra disease viruses. *Virus Research*. 95 (Sep. 1/2), 3-12
- Chalmers J., Kim E., Telford J., Wong E., Tacon W., Shuler M., Wilson D. 1990. Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing β -lactamase or human epidermal growth factor. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 104–111

- Day R. and Daggett V. 2003. All-atom simulations of protein folding and unfolding. *Advance in Protein Chemistry*. 66, 373–403
- Elster C., Larsen K., Gagnon J., Ruigrok R., Baudin F. 1997. Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localization signal. *Journal of General Virology*. 78, 1589 – 1596
- Elton D., Simpson M., Archer K, Medcalf L. 2001. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *The Journal of Virology*. 75 (10), 408 – 419
- Gehlen J., Marchi M., Chandler D. 1994. Dynamic affecting the primary charge transfer in photosynthesis. *Science*. 263, 499 – 502
- Gregoriades A. and Frangione B. 1981. Insertion of influenza M protein into the viral bilayer and localization of site of insertion. *The Journal of Virology*. October. 323 – 328
- Hankins R., Nagata K., Bucher DJ., Popple S., Ishihama A. 1989. Monoclonal antibody analysis of influenza virus matrix protein epitopes involved in transcription inhibition. *Virus Genes*. Vol. 3, 111–126
- Harris A., Forouhar F., Qui S., Sha B., Lou M. 2001. The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology*. 289, 34 – 44
- Jonsson A., Scott K., Daggett V. 2009. Dynameomics: a consensus view of the protein unfolding/folding transition state ensemble across a diverse set of protein folds, *Biophysical Journal*. 97, 2958–2966
- Kaye D and Pringle C. 2005. Aviar influenza viruses and their implication for human health. *Clinical Infectious Diseases*. 40, 108-12

- Kundu S., Roy D. 2008. Temperature-induced unfolding pathway of a type III antifreeze protein: insight from molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 27, 88–94
- Lamb R and Horvart C. 1991. Diversity of coding strategies in influenza viruses. *Reviews*. 7 (8), 261-266
- Lounnas V., Wade R. 1997. Exceptionally stable salt bridges in cytochrome P450cam have functional roles. *Biochemistry*. 36, 5402 – 5417
- Ma J., Singler B., Xu Z., Karplus M. 2000. A dynamic model for the allosteric mechanism of GroEL. *Journal of Molecular Biology*. 302, 303 – 313
- Martin K. and Helenius A. 1991a. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*. 67, 117 – 130
- Nayak D., Hui, W., Barman S. 2004. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Research*. 106, 147–165
- Nayak D., Balogun R., Yamada H. 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research*. 143(2), 147 – 61
- Noton S., Medcalf N., Fisher D., Mullin A., Elton D., Digard P. 2007. Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *Journal of General Virology*. 88, 2280-2290
- Olufsen M., Brandsdal B., Smalas A. 2007 Comparative unfolding studies of psychrophilic and mesophilic uracil DNA glycosylase: MD simulations show reduced thermal stability of the cold-adapted enzyme. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 26, 124–134
- Palese P, Schulman JL. 1976. Mapping of the influenza virus genome: Identification of the hemagglutinin and neuraminidase genes. *PNAS, USA*. 73, 2142-2146

- Rees P. and Dimmock N. 1981. Electrophoretic separation of influenza virus ribonucleoproteins. *Journal of General Virology*. Vol. 53. 125–132
- Ruigrok R., Calder L., Wharton S. 1989. Electron microscopy of the influenza submembranal structure. *Virology*. 173, 311 – 316
- Ruigrok R., Barge A., Durrer P., Brunner J. 2000. Membrane interaction of influenza virus M1 protein. *Virology* 267, 289 – 298
- Sambrook and Russel. 2001. *Molecular Cloning (A laboratory manual)*. Cold Spring Harbor Laboratory. 2nd Ed., Vol. 3.
- Sha B. and Luo M. 1997a. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of type A influenza virus matrix protein M1. *Acta Crystallographica*. Section D 53. 458–460
- Sha B., Luo M. 1997. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nature Structural Biology*. 4, 239 – 244
- Shishkov A. Goldanskii V., Baratova L. 1999. The in situ spatial arrangement of the influenza virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment. *PNAS, USA*. Vol. 96. 7827–7830
- SSA (Secretaria de Salud) del Distrito Federal. 2009. México D .F.
- Strandberg L., Enfors S. 1991. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 1669 – 1674
- Suzuki Y. 2005. Sialobiology of influenza molecular mechanism of range variation of influenza viruses. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 28 (3), 399-408

- Wakefield L. and Brownlee G. 1989. RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1. *Nucleic Acids Research*. Vol. 17, 8569–8580
- Watanabe K., Handa H., Mizumoto K., Nagata K., 1996. Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polimerase activity by matrix protein. *Journal of Virology*. January 241 – 247
- Whittaker G., Bui M., Helenius A. 1996. Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *Journal of Virology*. Vol. 70, 2743–2756
- Ye Z., Pal R. Fox J. 1987. Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. *The Journal of Virology*. Vol. 61, 239–246
- Young M., Gonfloni S., Superti- G., Roux B., Kuriyan J. 2001. Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and hck underlies their inactivation by C-terminal tyronine phosphorylation. *Cell*, 105, 115 – 126
- Zhirnov O. 1992. Isolation of matrix protein M1 from influenza viruses by acid-dependent extraction with nonionic detergent. *Virology*. Vol. 186, 324–330
- Zhirnov O. and Klenk H. 1997. Histones as a target for influenza matrix protein M1. *Virology*. Vol. 235, 302–310
- Zhirnov O, Ksenofontov A., Kuzmina S. 2002. Interaction of influenza A virus M1 matrix protein with caspases. *Biochemistry*. Vol. 67 (5), 534–539
- Zvonarjev A. and Ghendon Y. 1980. Influence of membrane (M) protein on influenza A virion transcriptase activity in vitro and its susceptibility to rimantadine. *The Journal of Virology*. Vol. 33, 583–586