



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS POR LA EXPRESIÓN DEL ORF1
DEL CALICIVIRUS FELINO”**

T E S I S

Que presenta

BIÓL. BRENDA BEATRIZ XOCONOSTLE MORÁN

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS
EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

Directora de la Tesis

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Ciudad de México

Febrero, 2017

El presente estudio fue realizado en el laboratorio 9 de Virología del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN por la estudiante Brenda Beatriz Xoconostle Morán con el número de registro de becario CONACYT 338856 y el número de apoyo 395420, bajo la dirección de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y la asesoría de la Dra Rossana Arroyo Verástegui y la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres.

Este proyecto fue financiado por el proyecto CONACYT de ciencia básica número 250696.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, me gustaría agradecer a la Dra. Lorena quien, además de otorgarme la oportunidad de integrarme en su equipo de trabajo, me ha brindado su confianza, paciencia, conocimiento y apoyo día a día, lo cual es sumamente valioso para mi. Mil gracias por animarme en aquellos momentos en los que estaba cabizbaja.

A la Dra. Rosa María del Ángel y a la Dra. Rossana Arroyo, por sus consejos en la escritura de mi tesis, así como el apoyo brindado en mi formación académica, en seminarios y pláticas. También agradezco al Dr. Juan Ludert, porque siempre me mostró su apoyo en este proyecto y en el laboratorio.

A la Dra. Cleotilde Cancio Lonches, a quien agradezco por todo el conocimiento, apoyo y paciencia, ya que suelo ser una persona sumamente calmada. Gracias por escucharme cuando me sentía muy mal y también muy feliz, sobre todo agradezco todos los ánimos y consuelo que me diste cuando no me sentía tan feliz.

Al Técnico Luis Chavarría, por su asistencia técnica, disposición y amabilidad.

Sin duda, agradezco a todos mis compañeros del laboratorio quienes, además de apoyarme en cuanto a técnicas, consejos y material, me hicieron desplegar muchas sonrisas con cada una de sus ocurrencias.

Aquellos compañeros que se convirtieron en amigos, Adriana, Oscar, Cleo y Yolo, muchas gracias por su amistad, la cual me ha enriquecido más que cualquier cosa material.

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mi hermano Gabriel, ya que me acompañaste en cada momento a pesar de estar tan lejos. Quisiera poder hacer una máquina que me transportara todos los días hacia donde tú estás, pero creo que la única máquina que existe hasta ahora, son los pensamientos y siempre estoy contigo. Gracias por esperarme siempre.

A mis papás, quienes me han dado todo lo que me ha hecho ser lo que soy, su apoyo incondicional y amor, son mi motor. Estoy agradecida con ustedes por dejarme volar hacia donde he querido, siempre los llevo en mi corazón. Mamá, gracias por apoyarme, ser mi consejera, paño de lágrimas y mi amiga, gracias por apoyarme en mis locuras. Papá, gracias por ser paciente conmigo, por ser mi amigo y siempre tener una sonrisa para mí y por brindarme sabios consejos.

A mi novio, compañero y gran amigo, Luis Pollo, esta tesis es producto de mucho esfuerzo y tú has sido testigo de ello, eres la persona quien ha vivido más de cerca cada alegría y frustración, además de ser muy paciente, me has dado tu amor y es lo que me ha hecho sonreír a pesar de las adversidades.

“Todo lo que yo invento, todo lo que yo imagino, quedará siempre más acá de la verdad, porque llegará un momento en que las creaciones de la ciencia superarán a las de la imaginación”

Julio Verne

ÍNDICE

1. NOMENCLATURA	8
2. LISTA DE FIGURAS	10
3. LISTA DE TABLAS.....	12
4. RESUMEN	13
5. INTRODUCCIÓN	15
6. ANTECEDENTES	17
6.1. Infecciones gastrointestinales	17
6.2. Norovirus humano	17
6.3 Calicivirus felino	18
6.3.1 Estructura genética del FCV	18
6.3.1.1 Proteínas no estructurales del FCV (ORF1)	20
6.3.1.2 Proteínas estructurales	23
6.3.2 Ciclo de replicación del FCV	24
6.3.2.1 Unión a la célula hospedera y desempaquetamiento	24
6.3.2.2 Traducción	24
6.3.2.3 Replicación del RNA genómico y subgenómico	25
6.3.2.4 Ensamblaje	27
6.4 Apoptosis	29
6.4.1 Apoptosis extrínseca.....	29
6.4.2 Apoptosis intrínseca.....	29
6.4.3 Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis.....	31
6.4.4 Modulación viral de la apoptosis.....	31
6.5 Inducción de la apoptosis por calicivirus	32
7. JUSTIFICACIÓN	34
8. HIPÓTESIS	35

9. OBJETIVO GENERAL	35
10. OBJETIVOS PARTICULARES	35
11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
12. MATERIALES Y MÉTODOS	38
12.1 Predicción de las estructuras 3D de las proteínas NS	38
12.1.1 Obtención de las secuencias de las proteínas NS	38
12.1.2 Predicción de las estructuras 3D y homologías estructurales	38
12.1.3 Análisis de los modelos obtenidos con I-tasser	38
12.2 Clonación de los fragmentos codificantes a NS1-5 y NS6/7	39
12.2.1 Cultivo celular y título viral	39
12.2.2 Aislados bacterianos y plásmidos	39
12.2.3 Selección de los sitios de restricción y diseño de oligonucleótidos iniciadores	40
12.2.4 Extracción de RNA totales	41
12.2.5 Síntesis del cDNA y purificación del producto de PCR	41
12.2.6 Clonación del fragmento purificado en vectores de transito	43
12.2.7 Subclonación del fragmento purificado en el vector de expresión	43
12.2.8 Transformación de las bacterias competentes con los plásmidos de interés	44
12.2.8.1 Obtención de células competentes	44
12.2.8.2 Protocolo de transformación por choque térmico	44
12.2.8.3 Purificación del DNA plasmídico mediante el método de lisis por ebullición (Boiling lysis)	45
12.2.9 Transfección en células CrFK	45
12.2.10 Extracción de proteínas, Western blot y electroforesis SDS-PAGE	46
13. RESULTADOS	48
13.1 Predicción de la estructura 3D y validación de los modelos calculados	48
13.2 Predicción de función	51
13.3 Clonación del fragmento codificante a NS1-5 en el vector de expresión pAmCyan1-N1	55

13.3.1	Clonación en los vectores de tránsito pCR 4-TOPO y pJET1.2.....	55
13.3.2	Secuenciación del vector pJET1.2-NS1-5	60
13.3.3	Subclonación en el vector de expresión pAmCyan1-N1	61
13.3.4	Transfección con lipofectamina del vector de expresión pAmCyan1-N1 en células CrFK	62
13.4	Clonación del fragmento codificante de NS6/7 en el vector de expresión pDsRed2-N1	63
13.4.1	Clonación en los vectores de tránsito pCR 4-TOPO y pJET1.2.....	63
13.4.2	Subclonación en el vector de expresión pDsRed2-N1.....	66
13.4.3	Secuenciación del vector pDsRed2-N1-NS6/7	68
13.5	Transfección con lipofectamina del vector de expresión pDsRed2-N1-NS6/7 en células Hek 293T	68
13.6	Expresión del mRNA correspondiente a la proteína NS6/7 fusionada con la proteína bandera con fluorescencia color rojo	76
14.	DISCUSIÓN	77
15.	RESUMEN DE RESULTADOS	85
16.	PERSPECTIVAS.....	85
17.	APÉNDICE	86
18.	BIBLIOGRAFÍA	98

1. NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
3D	Tercera dimensión
BH	Dominio de homología Bcl-2
CR	Complejos de replicación
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAc	ADN complementario
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
FCV	Calicivirus felino
g	Gramos
gRNA	Ácido ribonucleico genómico
IAPs	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
LC	Líder de la cápside
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros

mRNA	ARN mensajero
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NoV	Norovirus humano
NS	No estructural
nt	Nucleótido
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones de H
PMEM	Permeabilización de membrana externa de la mitocondria
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RHDV	Virus hemorrágico de conejo
RNA	Acido ribonucleico
RNT	Región no traducida
rpm	Revoluciones por minuto
sgRNA	Ácido ribonucleico subgenómico
TM	Temperatura de fusión
VP1	Proteína mayoritaria de la cápside
VP2	Proteína minoritaria de la cápside

2. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genoma del calicivirus felino.....	19
Figura 2. Sitios de escisión de la poliproteína de FCV.....	20
Figura 3. Modelos de la síntesis del RNA subgenómico (sgRNA).....	26
Figura 4. Ciclo de replicación de los calicivirus.....	28
Figura 5. Predicción de la estructura tridimensional de las proteínas NS de FCV.....	51
Figura 6. Amplificación del fragmento codificante a NS1-5 mediante PCR.....	56
Figura 7. DNA plasmídico de las clonas obtenidas del vector pJET1.2-NS1-5.....	57
Figura 8. Amplificación por PCR del fragmento codificante a NS1-5 del plásmido pJET1.2-NS1-5.....	57
Figura 9. Doble restricción del plásmido pJET1.2-NS1-5.....	58
Figura 10. DNA plasmídico de las clonas obtenidas del vector pCR 4-TOPO-NS1- 5.....	59
Figura 11. Amplificación por PCR del fragmento codificante a NS1-5 del plásmido pCR 4-TOPO-NS1-5.....	59
Figura 12. Doble restricción del plásmido pCR 4-TOPO-NS1-5.....	60
Figura 13. Doble restricción del plásmido pAmCyan1-N1.....	61
Figura 14. Transfección por lipofectamina del vector pAmCyan1-N1 en células CrFK.....	62
Figura 15. Amplificación del fragmento codificante a NS6/7 mediante PCR.....	63
Figura 16. DNA plasmídico de diez clonas obtenidas de la transformación de bacterias competentes con el vector pCR 4-TOPO- NS6/7.....	64
Figura 17. Amplificación por PCR del fragmento codificante a NS6/7 del plásmido pCR 4-TOPO-NS6/7.....	65
Figura 18. Doble restricción del plásmido pCR 4-TOPO-NS6/7.....	65
Figura 19. DNA plasmídico de las seis clonas obtenidas de la transformación de bacterias competentes con pDsRed2-N1-NS6/7.....	66

Figura 20. Amplificación por PCR del fragmento codificante a NS6/7 del plásmido pDsRed2-N1-NS6/7.....	67
Figura 21. Doble restricción del plásmido pDsRed2-N1-NS6/7.	67
Figura 22. Células HEK293T 24 horas postransfección con el vector pDsRed2-N1 por medio de liposomas.....	70
Figura 23. Células HEK293T 48 horas postransfección con el vector pDsRed2-N1 por medio de liposomas.....	72
Figura 25. Células HEK293T 48 horas postransfección con el vector pDsRed2-N1-NS6/7 por medio de liposomas.....	76

3. LISTA DE TABLAS

Tabla I. Oligonucleótidos iniciadores de la región codificante a la proteína NS1-5.....	40
Tabla II. Oligonucleótidos iniciadores de la región codificante a la proteína NS6/7	40
Tabla III. Programa de amplificación del fragmento codificante a NS1-5.....	42
Tabla IV. Programa de amplificación del fragmento codificante a NS6/7.	42
Tabla V. Valores QMEAN6 y Gráficos de Ramachandran	49
Tabla VI. Predicción de función de las proteínas NS	52
Tabla VII. Moldes de las proteínas estructuralmente homólogas a las proteínas NS	53

4. RESUMEN

Los Norovirus humanos (NoV) han sido catalogados como los principales agentes generadores de brotes de gastroenteritis a nivel mundial. Debido a que no se ha encontrado una manera de cultivarlo eficientemente, su estudio se ha desarrollado en modelos como el calicivirus felino (FCV). Uno de los procesos inducidos por los calicivirus, es la apoptosis celular, ya que facilita la liberación y diseminación de las partículas virales de la célula huésped, sin embargo, los factores virales responsables de la inducción de este proceso, no se encuentran del todo identificados. Es por ello que este estudio se centró en determinar si las proteínas no estructurales (NS) del FCV inducen apoptosis. Para ello, mediante la predicción de las estructuras 3D de las proteínas NS, se determinó su posible función por homología estructural con proteínas conocidas, encontrando que la proteína NS1 podría tener la capacidad de unirse al DNA y estar implicada en la transcripción o traducción; la NS2 podría fungir como una proteína de mimetismo celular implicada en el transporte de moléculas fuera o dentro de la célula; la proteína NS3, podría tener la función de ATPasa; la proteína NS4 podría tener actividad enzimática, debido a que posee homología estructural con proteínas asociadas con la degradación de glucosa y lactona; NS5 posee homología con proteínas asociadas con el control de la traducción y transcripción, ya que ésta es una proteína involucrada con la traducción del genoma viral y, la proteasa-polimerasa NS6/7, posee homología estructural con la proteína 3CD de poliovirus, así como con la polimerasa de coxsackievirus y poliovirus, lo cual se encuentra en función de los estudios ya reportados para este complejo proteico. Así mismo, se realizó la clonación de la secuencia codificante a la proteasa-polimerasa NS6/7 en un vector de expresión, el cual se transfectó en células HEK297T, obteniendo la señal de la proteína reportera, sin embargo, la actividad de la NS6/7 en las células transfectadas, no pudo ser determinada.

ABSTRACT

Human Norovirus has been cataloged as the main aethiologic agent of gastroenteritis outbreaks worldwide. Due to the lack of an efficient system for its propagation, its study has been done in models such as feline calicivirus (FCV). One of the main processes induced by calicivirus is cell apoptosis, since it facilitates the viral particles release and dissemination through the host cell; however, the viral factors that trigger this process have not been completely identified. Thus, the focus of this study, was to determine if FCV non-structural (NS) proteins induce apoptosis; first, the 3D structures of NS proteins were predicted by structural homology with known proteins. We found that NS1 could bind to DNA and it could be involved in transcription of translation; NS2 could act as a cellular mimicry protein involved in the molecules transport outside or inside of the cell; NS3 protein could be an ATPase; NS4 protein could have enzymatic activity, because it has a structural homology with proteins associated with glucose and lactone degradation; NS5 possesses a homology with proteins associated with the translation and transcription control , since it is a protein involved with the viral genome translation; NS6/7 protein has a strict homology with the poliovirus 3CD protein, coxsackievirus and poliovirus polymerase, based on in the previously reported functional ostudies for this protein complex. Moreover, we cloned NS6/7 protease-polymerase coding sequence in an expression vector, which was further transfected into HEK297T cells. The reporter protein signal was obtained. However, the activity of the NS6/7 protein could not be determined.

5. INTRODUCCIÓN

Los virus de la familia *Caliciviridae*, son patógenos obligados de varios animales, incluyendo a los humanos; esta familia se encuentra dividida en los siguientes géneros: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus*, y *Nebovirus*. Todos son virus pequeños no envueltos, con un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva, de un diametro entre 25 y 35 nm con una forma característica de “Estrella de David” (Figura 1) (Kapikian *et al.*, 1972).

Específicamente, los *Norovirus* humanos (NoV) representan un importante problema de salud, ya que son los agentes principales generadores de brotes de gastroenteritis a nivel mundial. Se estima que son responsables de 23 millones de casos de gastroenteritis en los Estados Unidos cada año y 200, 000 muertes de niños en países en desarrollo (Patel 2008; Scallan 2011). Debido a que no se ha encontrado una forma eficiente de cultivo para los NoV, su estudio se ha desarrollado mediante modelos filogenéticamente cercanos. Uno de ellos es el calicivirus felino (FCV) perteneciente al género *Vesivirus* (Carter *et al.*, 1991), el cual posee un crecimiento eficiente en cultivos celulares y para el cual se han establecido sistemas de genética reversa (Sosnovtsev *et al.*, 1998). El genoma del FCV, tiene un tamaño aproximado a 7.7 kb; en el extremo 3' se encuentra poliadenilado mientras que el extremo 5' posee una proteína viral (VPg) (Figura 1). Las proteínas virales se encuentran en tres marcos de lectura abiertos (ORF's): el ORF1 codifica a una poliproteína que corresponde a las proteínas no estructurales (NS) que incluyen a una proteasa viral y a una RNA polimerasa dependiente de RNA. Esta poliproteína es escindida postraduccionalmente por la proteasa viral. EL ORF2 codifica a la proteína mayoritaria de la cápside (VP1) y el ORF3 codifica a la proteína estructural minoritaria (VP2) (Seal *et al.*, 1993; Sosnovtsev *et al.*, 2000).

Los virus han desarrollado una serie de estrategias para contrarrestar los mecanismos de defensa llevados a cabo por las células infectadas. A través del proceso de co-evolución entre el patógeno y el hospedero, los virus han adquirido

la capacidad para prevenir la apoptosis celular, proceso por el cual son eliminadas las células infectadas (Castanier *et al.*, 2011). Sin embargo, varios virus pueden inducir la apoptosis para facilitar la liberación y diseminación de las partículas virales, prevenir la presentación de antígenos de las células infectadas, inducir la muerte de células no infectadas o células del sistema inmune que podrían limitar la propagación viral (Neumann *et al.*, 2015). Los FCV inducen cambios característicos de apoptosis intrínseca, los cuales incluyen, translocación de fosfatidil serina hacia el exterior de la membrana plasmática, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA, además del incremento en la activación de las caspasas 3, 8 y 9 (Sosnovtsev *et al.*, 2003). Recientemente, se ha sugerido que la proteína líder de la cápside, que forma parte del precursor de la proteína mayoritaria de la cápside codificada por el ORF2, está asociada con la inducción de la apoptosis (Abente *et al.*, 2013). En contraste, se ha determinado que la expresión del ORF1 de *Norovirus* murino (MNV), induce la apoptosis en células HEK293T (Herod *et al.*, 2014). Por ende, en este proyecto se estandarizaron las herramientas para determinar el potencial apoptótico de las proteínas no estructurales del FCV mediante su clonación y expresión en células CrFK.

6. ANTECEDENTES

6.1. Infecciones gastrointestinales

Las infecciones agudas del tracto intestinal figuran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes. Según la OMS, a nivel mundial la tasa de muerte asociada con dichas infecciones, es alrededor de 2.2 millones de muertes por año, las cuales pueden ser causadas por bacterias, virus o protozoarios patógenos. En México, en un estudio gubernamental realizado en 2003, se reportaron 4, 556 decesos causados por infecciones intestinales (Paniagua *et al.*, 2007).

Las enfermedades gastrointestinales infecciosas, son causadas por bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Shigella spp*; parásitos protozoarios como *Giardia lamblia* y diversas especies de amibas. Este tipo de enfermedades también son generadas por virus, principalmente los rotavirus, astrovirus, adenovirus y los norovirus humanos, cuyo prototipo es el virus Norwalk, que pertenece a la familia *Caliciviridae* (Hernández *et al.*, 2011).

6. 2. Norovirus humano

Los NoV son una de las principales causas de brotes de gastroenteritis no asociada a bacterias a nivel mundial. Los NoV pertenecen al género *Norovirus* de la familia *Caliciviridae*, A pesar de su importancia clínica, el estudio de su patogénesis ha sido limitado debido a que su propagación *in vitro* aún se encuentra en desarrollo (Duizer *et al*, 2004), por ende, su estudio se ha llevado a cabo en diferentes modelos filogenéticamente cercanos (Vashist *et al.*, 2009). Un ejemplo importante es el calicivirus felino (FCV), miembro del género *Vesivirus*, el cual puede ser propagado en cultivos celulares (Sosnovtsev y Green, 1995).

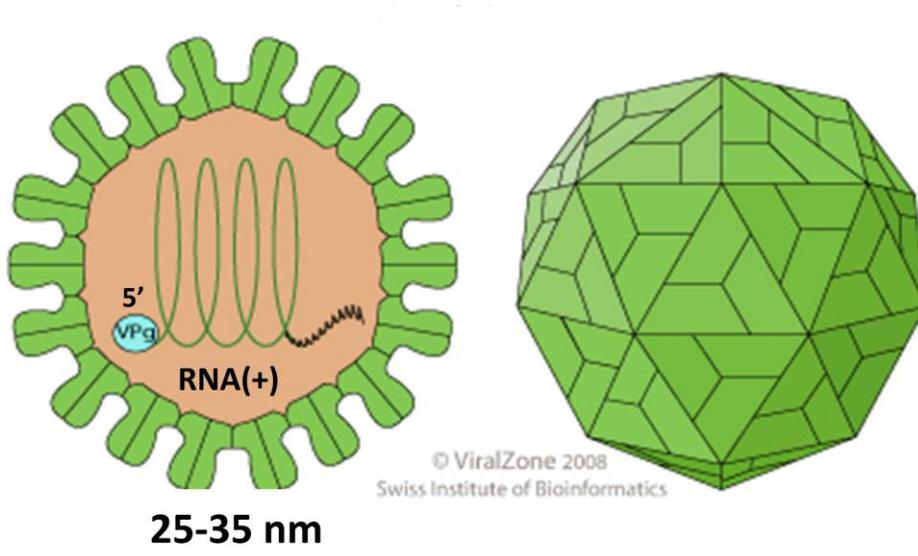
6.3 Calicivirus felino

El FCV es miembro del género *Vesivirus* que infecta a gatos, generando una enfermedad cuyos signos clínicos varían entre las diversas cepas de FCV, como: cuadros de conjuntivitis, ulceración oral, afectaciones en las vías respiratorias altas y, en los casos severos, infección sistémica (Gaskell, 1985; Pesavento *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de que su patogenia es distinta a la que se presenta en los NoV, la organización genética es muy semejante entre ambos géneros.

6.3.1 Estructura genética del FCV

El genoma de FCV, está compuesto por tres marcos de lectura abiertos (ORFs), los cuales se esquematizan en la Figura 1 (Tohya *et al.*, 1991; Carter, 1991). El ORF1, codifica a las proteínas no estructurales (Neill, 1990); el ORF2, codifica al precursor de la proteína de la cápside y, en el extremo 3', se encuentra el ORF3, que codifica a una proteína estructural pequeña o VP2 (Neill *et al.*, 1991). La secuencia nucleotídica entre la unión del ORF1-ORF2 y ORF2-ORF3, es absolutamente conservada. El codón de terminación del ORF1 está seguido por dos bases, mientras que la primera base del codón de inicio del ORF2, posee un marco de lectura -1 con respecto al ORF1. El ORF3 posee un marco de lectura -1 con respecto al ORF2 pero, en este caso, el codón de terminación del ORF2, se empalma con el codón de inicio del ORF3 por cuatro nucleótidos (Herbert *et al.*, 1996).

A)



B)

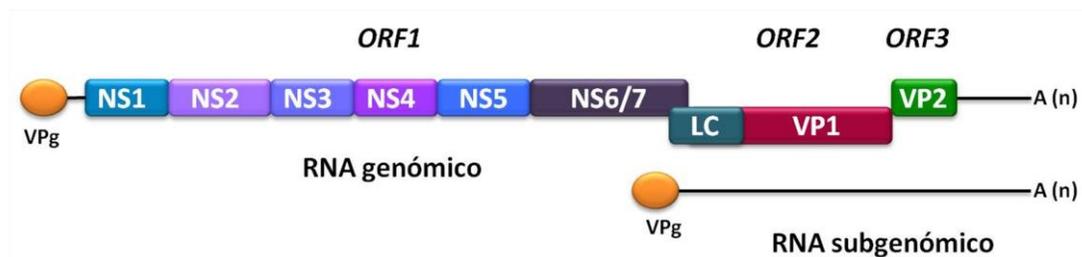


Figura 1. Genoma del calicivirus felino. **A)** Los calicivirus son virus con un tamaño de 25 a 35nm, son no envueltos, su genoma es de RNA de cadena simple y polaridad positiva, posee un tamaño aproximado a 7.7 kb; el extremo 3' se encuentra poliadenilado mientras que el extremo 5' posee una proteína viral (VPg). **B)** La organización genética del FCV, consiste en tres marcos de lectura abiertos. El ORF1 codifica a las proteínas no estructurales; el ORF2, da lugar a la proteína mayoritaria de la cápside (VP1) que posteriormente es procesada para dar origen a la proteína líder de la cápside (LC) y a la VP1 madura. El ORF3, codifica a la proteína minoritaria de la cápside (VP2). A partir del RNA subgenómico, se sintetizan las proteínas codificadas por los ORF2 y 3. La proteína viral VPg, necesaria para la traducción, se encuentra representada por un óvalo naranja.

Modificado de Green *et al.*, 2000.

6.3.1.1 Proteínas no estructurales del FCV (ORF1)

El codón de inicio del ORF1, comienza en el nucleótido 19 y procede hasta el nucleótido 5314. La poliproteína producida por este marco de lectura, contiene a todas las proteínas no estructurales, las cuales se encuentran en un rango de tamaño entre 13 y 96kDa, (Carter *et al.*, 1992). Esta poliproteína produce una proteasa que escinde sitios con residuos E, A, D, N y S en la posición P1, además, es la encargada del procesamiento de la poliproteína, dando lugar a 6 proteínas maduras (Figura 2) (Sosnovtsev *et al.*, 2002). En el caso particular del FCV, la proteasa y polimerasa no son escindidas, por ende, siempre están presentes como proteína única denominada NS6/7 con actividad de proteasa y polimerasa.

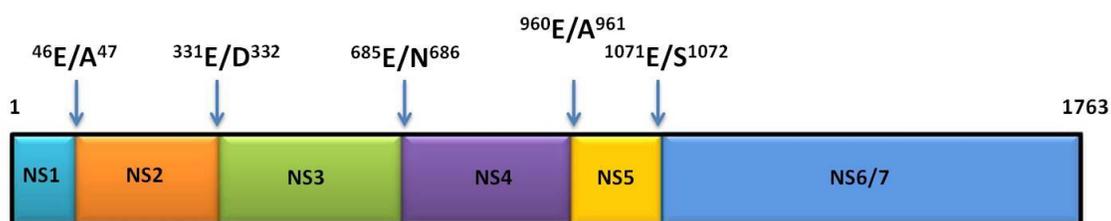


Figura 2. Sitios de escisión de la poliproteína de FCV. La proteasa viral escinde a la poliproteína en los sitios indicados con una flecha azul, dando lugar a las 6 proteínas no estructurales NS1-NS6/7.

NS1 y NS2

La función de la proteína NS1 de los miembros de la familia *Caliciviridae*, no ha sido descrita, sin embargo, en NoV se ha encontrado asociada al Aparato de Golgi. La proteína NS2 tiene secuencia análoga a otras proteínas virales y celulares implicadas en la regulación de la proliferación celular. Posiblemente se encuentra relacionada con el anclaje de los complejos de replicación (CR) unidos a la membrana, ya que se ha reportado que interactúa con las proteínas NS3, NS4 y NS6/7 (Ettayebi *et al.*, 2003; Kaiser *et al.*, 2006; Bailey, 2010).

NS3 (NTPasa 2C-like)

Mediante el análisis de la secuencia de la proteína NS3 de diversos miembros de la familia *Caliciviridae*, se determinó que es la menos divergente del ORF1 y muestra similitud con la proteína 2C de los *Picornavirus*, además posee secuencias conservadas que corresponden a dominios de unión a NTP, los cuales están asociados con la actividad NTPasa (Gorbalenya *et al.*, 1989; Neil, 1990; Clarke y Lambden, 1997). Específicamente, la proteína NS3 de FCV posee una alta homología con la NTPasa del virus hemorrágico del conejo (RHDV por sus siglas en Inglés “Rabbit Haemorrhagic Disease Virus”) (Meyers *et al.*, 2000). En células infectadas con FCV, ésta proteína se encuentra asociada a los complejos de replicación, sugiriendo que posee un papel en la replicación del genoma viral (Green *et al.*, 2002).

NS4

La función de la proteína NS4 es desconocida, aunque se ha observado que forma parte de un precursor que contiene a la VPg y a la proteína NS6. La proteína NS4 se encuentra presente en los complejos membranales (Green *et al.*, 2002).

NS5 o VPg

El extremo 5' del RNA genómico (gRNA) y el RNA subgenómico (sgRNA) de calicivirus se encuentra unido covalentemente a una proteína viral llamada VPg, la cual posee un tamaño entre 10-15kDa (Clarke y Lambden, 2000; Sosnovtsev *et al.*, 2002). La secuencia que codifica a la VPg de calicivirus, se encuentra antes de la secuencia codificante a la cisteína proteasa-polimerasa NS6/7 (Clarke y Lambden, 2000).

El RNA mensajero (mRNA) del calicivirus, no posee la estructura “cap” en el extremo 5' y no existe evidencia de que los calicivirus posean un sitio de unión

interna del ribosoma o IRES que dirija la traducción del mRNA viral (Clarke y Lambden, 2000). Se ha demostrado que la remoción de la VPg del RNA viral mediante su digestión con proteasas, genera una pérdida de infectividad y reduce significativamente la traducción del RNA de FCV *in vitro* (Herbert *et al.*, 1997). Además, se ha determinado que la VPg recombinante, se une al factor de iniciación eucariótico 3 (eIF-3) *in vitro* y en lisados celulares (Daughenbaugh *et al.*, 2003). La interacción entre la VPg y eIF4E es requerida para la traducción viral, ya que la proteína 4E-BP1 (proteína 1 de unión a 4E) que inhibe a eIF-4E, impide la traducción dependiente de VPg *in vitro* (Goodfellow *et al.*, 2005). Es por ello que se ha determinado que la VPg funciona como un sustituto de cap o cap proteinaceo para permitir el reclutamiento de los factores de iniciación eucariótica y de ésta manera iniciar la síntesis de las proteínas virales.

NS6/7 (Proteasa 3C-like-polimerasa)

La proteasa-polimerasa NS6/7 se encuentra formada por un complejo estable de 76 kDa que contiene una actividad de cisteína proteasa en el extremo amino terminal (NS6) y una de RNA polimerasa dependiente de RNA o RdRp (NS7) que polimeriza a las moléculas de RNA.

El análisis estructural ha revelado que existen cuatro aminoácidos cruciales para la actividad de la proteasa-polimerasa: NS6/7: H39, E60, C122 y H137 en FCV. En FCV, la proteasa genera la escisión en cinco sitios de la poloproteína, los cuales son E46/A47, E331/D332, E685/N686, E960/A961 y E1071/S1072 (Figura 2) (Sosnovteva *et al.*, 1999; Oka *et al.*, 2007).

La proteasa-polimerasa NS6/7 también juega un papel importante en el establecimiento de la infección, ya que causa la inhibición de la traducción celular durante la infección con el FCV mediante la escisión e inactivación de la proteína de unión a trectos de Poli(A) (PABP), removiendo su dominio C-terminal y

generando la reducción de la traducción del mRNA celular en los estados tardíos de la infección (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2004).

La RdRp (NS7) es la proteína responsable de la replicación del genoma de los calicivirus. En FCV, la forma activa de la RdRp es el precursor NS6/7, que posee la función de proteasa y polimerasa. La escisión proteolítica entre los dos dominios, no es necesaria para la actividad de la polimerasa y, la molécula precursora NS6/7, se acumula significativamente en células infectadas por FCV *in vitro* (Sosnovtseva *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2001).

6.3.1.2 Proteínas estructurales

Las proteínas estructurales VP1 y VP2 se encuentran codificadas en el genoma viral, sin embargo, su síntesis se lleva a cabo a partir de un sgRNA que es idéntico a los ORF2 y 3. La síntesis del sgRNA resulta en un mecanismo eficiente para producir grandes cantidades de la proteína de la cápside (Herbert *et al.*, 1996).

Proteína mayoritaria de la cápside (VP1)

El ORF2 comienza en el nucleótido 5314 y, debido a que se empalma con el ORF1, el ORF2 posee un marco de lectura -1 con respecto al marco de lectura 1. El ORF2 del FCV codifica a un precursor de la cápside de aproximadamente 73 kDa, el cual es postraduccionalmente procesado para liberar a la proteína de la cápside madura (VP1) y a una pequeña proteína de 124 aminoácidos, llamada líder de la cápside (LC), implicada en el establecimiento del efecto citopático (Clarke y Lambden, 1997; Carter, 1989; Sosnovtsev *et al.*, 1998; Abente *et al.*, 2013).

Proteína minoritaria de la cápside 2 (VP2)

Todos los calicivirus poseen una o dos copias de la proteína de la cápside VP2 en cada virión maduro (Sosnovtsev y Green, 2000). Esta proteína está codificada dentro del ORF3 (Clarke y Lambden, 2000). La proteína producida es de 8.5 a 23 kDa dependiendo del género, específicamente el tamaño de la VP2 de FCV es de 12.2 kDa. Por medio de ensayos de eliminación del ORF3 completo del genoma de FCV, así como eliminaciones de algunos fragmentos de este ORF y la introducción de codones de paro, se demostró que la proteína VP2 es esencial para la síntesis y maduración de las partículas virales, ya que los cambios ya mencionados, generan partículas virales incapaces de infectar (Carter *et al.*, 1991; Sosnovtsev *et al.*, 2005).

6.3.2 Ciclo de replicación del FCV

6.3.2.1 Unión a la célula hospedera y desempaquetamiento

El ciclo de replicación de los calicivirus comienza con la internalización del virión mediada por receptor. Específicamente, el receptor en FCV es la molécula “Junctional Adhesión Molecule 1 -1” (JAM-1) (Makino *et al.*, 2006). El proceso de penetración y desempaquetamiento durante la infección con FCV, es conducido por la ruta endocítica mediada por clatrina, seguido de un paso dependiente del cambio de pH llevado a cabo por agentes lisosomotrópicos que generan la acidificación de las vesículas, lo cual conduce a la liberación del RNA viral hacia el citoplasma (Kreutz y Seal, 1995).

6.3.2.2 Traducción

Una vez liberado el RNA viral en el citoplasma, éste actúa como mRNA y es traducido por la maquinaria celular (Figura 3). El genoma de los calicivirus posee dos regiones no traducidas (RNT) en sus extremos terminales, que funcionan

como reguladores de la traducción y la replicación viral. La RNT 5' es muy corta en esta familia de virus (entre 5 y 20 nt dependiendo del virus) y el RNA viral no posee la estructura "cap". Sin embargo, tiene unida covalentemente a la proteína viral VPg, la cual se encarga de reclutar a los factores del inicio de la traducción eIF3, eIFGI, eIF4G, con la proteína ribosomal 6S y la subunidad ribosomal 40S para que se lleve a cabo el inicio de la traducción. Cabe destacar que los requerimientos particulares de cada uno de estos factores en la replicación de los distintos virus de la familia estudiados, son diferentes (Daughenbaugh *et al.*, 2003). La traducción de la poliproteína y su procesamiento co-traduccional por la NS6/7, da lugar a la liberación de las proteínas NS, las cuales están involucradas con los complejos enzimáticos que replican el genoma viral y sintetizan el RNA antigenómico (CR).

Así mismo, los calicivirus producen un sgRNA de cadena simple y polaridad positiva de 2.4 kb (Neill y Mengeling, 1988). Este sgRNA también es poliadenilado en el extremo 3' y, al igual que el gRNA, está unido covalentemente a la proteína VPg en el extremo 5', la cual promueve la traducción de las proteínas VP1 y VP2 (Herbert *et al.*, 1996).

6.3.2.3 Replicación del RNA genómico y subgenómico

A partir del gRNA, se sintetiza RNA de polaridad negativa, el cual es usado como molde para la síntesis tanto del RNA de cadena positiva (gRNA) como del sgRNA. La síntesis de RNA en FCV es llevada a cabo en el citoplasma en la región perinuclear. Al inicio de la síntesis de RNA, la nucleolina se relocaliza del núcleo hacia el nucleoplasma, así como a la región perinuclear, donde colocaliza con la RdRp (Cancio *et al.*, 2011). Se ha determinado que los FCV forman CR asociados con las membranas intracelulares y con varias proteínas no estructurales, como la NS6/7, NS4-VPg, NS4 y NS2, así como la NTPasa, sugiriendo que estas proteínas participan en la replicación del RNA viral (Green *et al.*, 2002).

Se ha descrito en el FCV un mecanismo que involucra un “sitio de unión ribosomal río arriba del sitio de terminación” (TURBS), que regula la tasa de producción de las proteínas VP1/VP2 durante el proceso de replicación (Luttermann y Meyers, 2007).

Existen dos modelos propuestos para explicar la síntesis del sgRNA, los cuales se muestran en la Figura 3. El primero, es el modelo de iniciación interna, en el cual la polimerasa sintetiza la cadena de polaridad positiva del sgRNA a partir de un promotor interno presente en la hebra de RNA de polaridad negativa. En el modelo de terminación prematura, la polimerasa se disocia a partir de un templado genómico en el terminador inicial, conduciendo la síntesis y acumulación de la cadena negativa truncada (o RNA subgenómico), la cual servirá como templado para generar la cadena positiva de RNA subgenómico (Miller *et al.*, 1985; Miller y Koev, 2000).

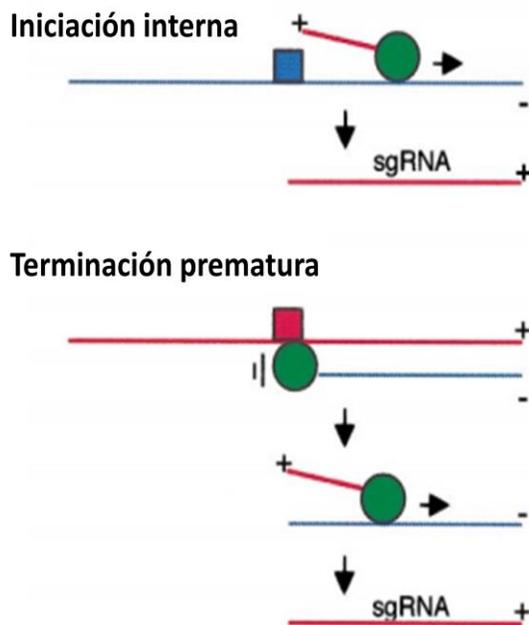


Figura 3. Modelos de la síntesis del RNA subgenómico (sgRNA). Las líneas azul (-) y roja (+) representan la polaridad positiva y negativa del RNA, respectivamente. Los sitios de inicio de la transcripción del RNA genómico se encuentran representados por las cajas azules y las secuencias de terminación por las rojas. El RNA templado está representado por la línea gruesa roja y su complementario por la línea gruesa azul. Los círculos verdes representan a la replicasa viral y las barras verticales el final de la transcripción.

En *Norovirus* y *Vesivirus*, la transcripción del sgRNA produce grandes cantidades de las proteínas estructurales VP1 y VP2 (Matsuura *et al.*, 2000; Sosnovtsev *et al.*, 1998). Se ha demostrado que el sgRNA es empaquetado dentro de partículas virales. La encapsidación del sgRNA, dirige la producción de partículas virales de baja densidad, también llamadas partículas defectuosas, las cuales no poseen función aparente. Los aislados de FCV con baja virulencia, producen más partículas defectuosas (Neill, 2002).

6.3.2.4 Ensamblaje

En un punto dado en el ciclo de multiplicación, el sgRNA es empaquetado y posteriormente los viriones maduros son liberados hacia el exterior de la célula. Las proteínas estructurales también se encuentran asociadas con los CR, indicando que las membranas de los complejos de replicación podrían formar un andamio para empaquetar el RNA viral. Finalmente, en el último estado de la replicación, los FCV inducen apoptosis en las células huésped, sugiriendo que este proceso favorece la diseminación de la progenie viral en el huésped. En la Figura 4 se esquematiza el ciclo de replicación de calicivirus (Al-Molawi *et al.*, 2003; Sosnovtsev *et al.*, 2003).

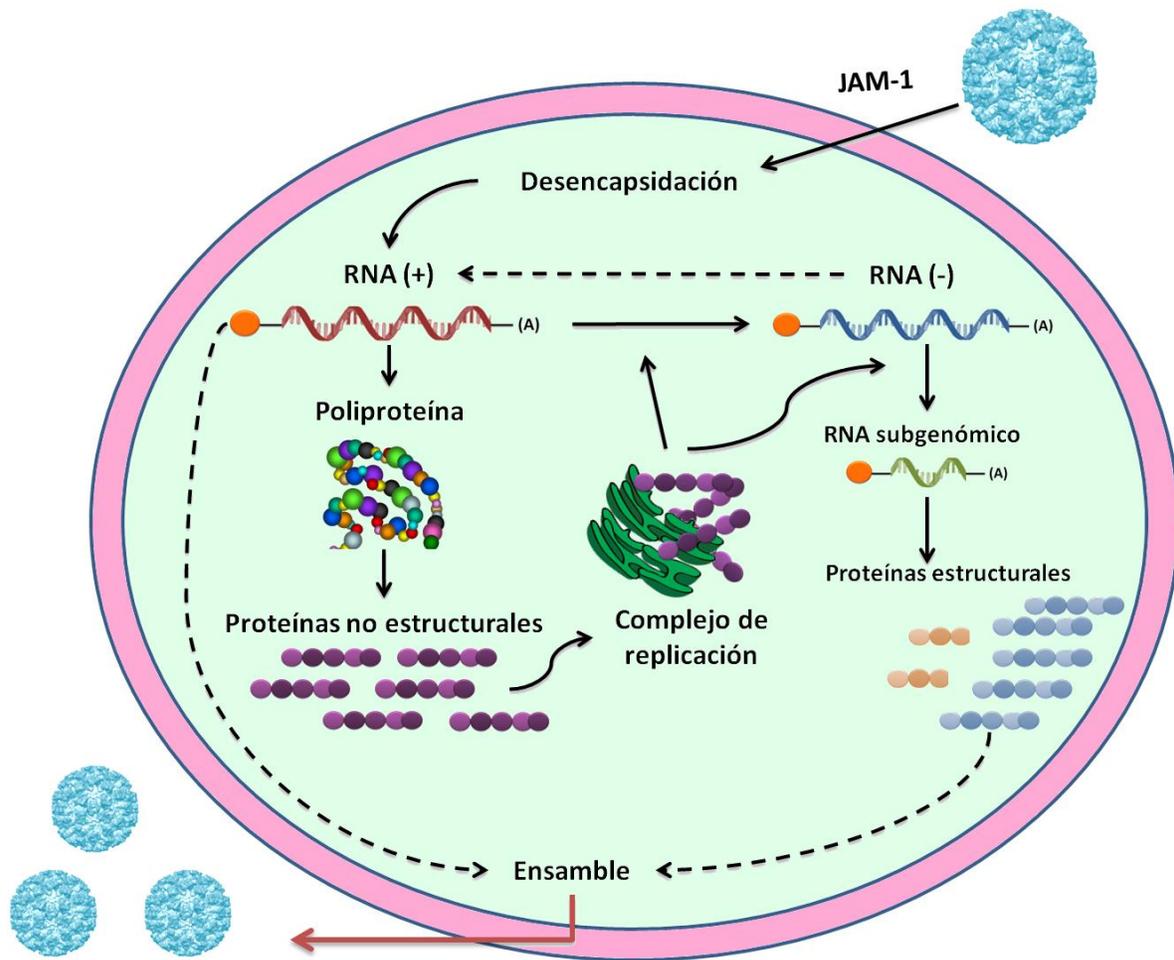


Figura 4. Ciclo de replicación de los calicivirus. Después de la unión al receptor celular, el virión se internaliza en la célula, generando el desnudamiento del genoma viral, seguido por la traducción de la poliproteína precursora y el procesamiento co-traduccional, liberando las proteínas no estructurales. Estas proteínas se reúnen en un complejo de replicación que sintetiza el RNA antigenómico, el cual es usado como molde para la síntesis de los RNAs genómico y subgenómico. Los RNAs genómicos recién sintetizados se traducen como un precursor de la poliproteína o se utilizan para el empaquetamiento en el ensamblado de la proteína viral. El RNA subgenómico codifica a las proteínas estructurales, VP1 y VP2. En un momento aún no definido en el ciclo de vida del virus, se produce el ensamblaje de las proteínas estructurales, así como el empaquetamiento del RNA genómico, procesos que son concomitantes para la formación de la partícula viral, seguido por la liberación del virión maduro de la célula.

Modificado de Rohayem *et al.*, 2010.

6.4 Apoptosis

La apoptosis es un proceso altamente coordinado para controlar la homeostasis celular en organismos multicelulares en respuesta a un amplio rango de estímulos, incluyendo estrés e infecciones virales (Vaux y Strasser, 1996). La apoptosis es inducida por dos rutas de señalización: la extrínseca y la intrínseca.

6.4.1 Apoptosis extrínseca

La vía extrínseca es desencadenada por ligandos extracelulares que se unen específicamente a sus respectivos receptores de superficie, causando su oligomerización (Strasser *et al.*, 2009). Un cambio conformacional sobre la cara citoplasmática de dichos receptores, conduce el reclutamiento de la proteína adaptadora FADD, cuya función es atraer a la pro-caspasa 8 desde el citosol hacia el receptor de muerte con el fin de llevar dos moléculas monoméricas de pro-caspasa 8 en la proximidad más cercana para su autoprocesamiento y activación subsecuente. Este complejo, referido como complejo de señalización inductor de muerte (DISC), interactúa con el efector ya dimerizado pro-caspasa 3 y/o pro-caspasa 7, que se activa a través de la escisión mediada por la caspasa 8, seguida del autoprocesamiento. El efector activo de caspasas, escinde varios sustratos que inducen la alteración del citoesqueleto, inhibición de la reparación del DNA, inicio de la fragmentación del DNA y la exposición de señales que conducen la eliminación de células apoptóticas por macrófagos (Neumann *et al.*, 2015).

6.4.2 Apoptosis intrínseca

La vía intrínseca de apoptosis es activada por la falta de factores de sobrevivencia solubles, hormonas, interacciones célula-célula y célula-matriz, la exposición de células a patógenos como los hongos, bacterias y virus o el tratamiento con estímulos genotóxicos y de daño a DNA (como la radiación y fármacos

quimioterapéuticos), toxinas o pro-oxidantes, así como agentes que generan estrés al retículo endoplásmico, inhibición de las proteínas cinasas, degradación proteosomal o perturbación del citoesqueleto (Youle y Strasser, 2008; Hotchkiss *et al.*, 2009). El paso crítico de esta ruta, es la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (PMEM), que genera la liberación de factores apoptogénicos desde el espacio intermembranal de la mitocondria. Una de estas proteínas es el citocromo c, que se une a la proteína adaptadora Apaf-1 que recluta a la pro-caspasa-9 citosólica dentro de un complejo heptamérico llamado apoptosoma. La caspasa-9 se dimeriza sobre la plataforma apoptosomal conduciendo el autoprocésamiento y activación inducidos por proximidad. La caspasa-9 activa se escinde y activa a las caspasas-3 y -7 efectoras. Existen otras proteínas que son liberadas desde la mitocondria y que estimulan un proceso de muerte celular desconocido independiente de caspasas.

La PMEM es un resultado de la señalización de muerte celular dependiente e independiente de caspasas, éste es un punto de revisión en el cual se toma la decisión entre mantener la vida de la célula o inducir su muerte; así mismo, se ha determinado que es un punto de no retorno. Este punto de revisión es controlado por la familia de proteínas Bcl-2 (Youle y Strasser, 2008; Chipuk *et al.*, 2010). La familia Bcl-2, está subdividida en base a su estado de conservación estructural de los llamados “dominios de homología de Bcl-2” (BH). Las proteínas pro-apoptóticas que contienen dominios BH3 (Bim, Bid, Bad, Bik, Bmk, Htk, Puma, Noxa) sólo comparten entre 20 y 30 aminoácidos a lo largo de la hélice alfa del dominio BH3 con el resto de la familia Bcl-2. Éstos actúan como sensores del estímulo apoptótico que activa la ruta mitocondrial intrínseca (Happo *et al.*, 2012). Dependiendo del estímulo apoptótico, un grupo particular de proteínas es transcripcionalmente inducido o postraduccionalmente modificado, migra y se inserta en la MEM, activando en este sitio, una segunda subclase de proteínas de la familia Bcl-2, llamada “efectores” Bax y Bak (Happo *et al.*, 2012). Bax y Bak inducen directamente la PMEM, ambas contienen dominios BH1, BH2 y BH3, que forman un complejo de unión hidrofóbica que interactúa con otros miembros de la

familia Bcl-2 (Suzuki *et al.*, 2000; Borner y Andrews, 2014). En células sanas, Bax reside en su forma inactiva en el citoplasma y la periferia de la MEM. Por otro lado, Bak se encuentra inserto establemente en la MEM, pero se mantiene bajo control por proteínas inhibitorias como VDAC2 y Bcl-2 (Wang *et al.*, 2001). Las proteínas Bin, Bid y Puma, son capaces de activar directamente a Bax/Bak en la MEM (Letai *et al.*, 2002).

El tercer subgrupo de la familia Bcl-2, está formado por las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, Bcl-w y A1 (Youle y Strasser, 2008). Estas proteínas contienen dominios BH1, BH2 y BH3, algunas de ellas poseen un dominio adicional BH4 en la región N-terminal.

6.4.3 Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis

La actividad de las caspasas está sujeta a la inhibición por los miembros de la familia de “Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis” (IAPs). Por ejemplo, Smac/DIABLO y Htr2A/Omi se unen a XIAP, miembro de las IAPs que participa como inhibidor endógeno de las caspasas-9 y -3, previniendo su autoproteólisis accidental en células sanas (Deveraux y Reed, 1999). XIAP no se une a las caspasas-9 y -3, hasta que es secuestrado por Smac u Omi, por ende, permite la activación completa de dichas caspasas en respuesta a estímulos apoptóticos, activando la vía mitocondrial intrínseca.

6.4.4 Modulación viral de la apoptosis

Dada la importancia de la ruta intrínseca mitocondrial de la apoptosis, los virus han adquirido diferentes estrategias para inhibirla. Por ejemplo, la generación de productos genéticos que mimetizan la acción de los factores de supervivencia Bcl-2 para potenciar la inhibición de la PMEM, inducir inhibición de la vía intrínseca de apoptosis mediante la modulación de los miembros de la familia Bcl-2 a nivel

transcripcional o mediante modificaciones postraduccionales. Así mismo, han desarrollado estrategias para inhibir a p53 o, en contraste, inducen la activación de NF κ B para inducir la inhibición de la apoptosis, entre otros mecanismos como el bloqueo de la actividad de las caspasas.

Algunos virus han desarrollado estrategias para activar la muerte de las células hospederas infectadas, probablemente para evadir la presentación de antígenos virales. Cabe resaltar que la apoptosis inducida no elimina ni daña a los virus nuevos. Por ejemplo, mediante la proteína Vpr, los HIV pueden activar la ruta intrínseca mitocondrial, induciendo el hinchamiento de la mitocondria y la PMEM (Stewart *et al.*, 1999; Jacotot *et al.*, 2000). El coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV) posee una proteína que inhibe directamente a Bcl-xL y otros factores de sobrevivencia (Tan *et al.*, 2007). Algunos virus codifican proteasas que escinden proteínas con dominios BH3 como Bid. Estas proteasas son requeridas para el ciclo de replicación, ya que procesan polipéptidos precursores de proteínas estructurales y no estructurales (Strauss y Strauss, 1994). Algunas de las proteasas virales, son capaces de escindir componentes importantes de la apoptosis y, por ende, activar dicha ruta. Por ejemplo, los lentivirus puma (PLV), sintetizan dos proteasas (2Apro y 3Cpro) que activan la apoptosis dependiente de caspasas (Barco *et al.*, 2000; Calandria *et al.*, 2004). Los HIV codifican a una proteasa que es capaz de procesar y activar la caspasa-8 *in vitro* y en células T, conduciendo la escisión de Bid y la apoptosis mediada por mitocondria (Nie *et al.*, 2002).

6.5 Inducción de la apoptosis por calicivirus

Se ha observado que la replicación de FCV en células CrFK genera la inducción de cambios característicos de la apoptosis intrínseca, los cuales incluyen la translocación de fosfatidil serina hacia el lado externo de la membrana plasmática, condensación de cromatina y fragmentación del DNA. La infección por FCV ha sido asociada con el incremento de la actividad de las caspasas 3, 8 y 9

(Sosnovtsev *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado que los FCV inducen la ruta mitocondrial de la apoptosis a través de la translocación de Bax desde el citosol a la mitocondria, generando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, liberación de citocromo c de la mitocondria hacia el citoplasma y la activación de las caspasas-9 y -3 (Natoni *et al.*, 2006). En otros calicivirus, como el MNV, se ha registrado que en el proceso de replicación se induce la apoptosis en células RAW264.7 infectadas, sistema en el cual se demostró que la muerte celular se encuentra asociada con la activación de las caspasas-9 y -3 a través de la vía mitocondrial (Bok *et al.*, 2009; Furman *et al.*, 2009).

Se ha propuesto que la apoptosis inducida por los calicivirus facilita la liberación y propagación de la progenie viral, así mismo, se crea una ventana de tiempo más amplia para la replicación del virus y, se ha sugerido, que la inducción de la apoptosis genera protección contra la respuesta inmune (Deng *et al.*, 2008; O'bien, 1989, Tren *et al.*, 2013)

Hoy en día se desconoce qué componente o componentes virales son responsables de la inducción de la apoptosis por parte de los calicivirus. Durante la infección por FCV, mediante ensayos de clonación de la LC, así como su transfección en células CrFK, se ha relacionado a esta proteína con los efectos citopáticos generados por el virus (Abente *et al.*, 2013) sin embargo no se pudo demostrar la inducción de la actividad de caspasas. Por otro lado, la expresión del ORF1 completo de MNV mediante un sistema de expresión inducible en células eucarióticas regulado por tetraciclina, indujo apoptosis, caracterizada por la activación de la caspasa-9 y la subregulación de survivina (Herod *et al.*, 2014).

7. JUSTIFICACIÓN

La apoptosis intrínseca es un proceso inducido por proteínas virales NS y por proteasas virales.

Particularmente, se conoce que los miembros de la familia *Caliciviridae* inducen la apoptosis como un proceso para que se lleve a cabo la replicación viral y la diseminación de la progenie viral en el huésped. Se sabe que se necesita una replicación activa para que se induzca la apoptosis; específicamente, la proteína LC de FCV está asociada con la inducción de este proceso, mientras que en el MNV se sabe que se induce con la expresión de las proteínas no estructurales. Sin embargo, no se conoce el papel de las proteínas NS en la inducción de la apoptosis por la infección con el FCV. El determinar si alguna proteína NS, como la proteasa, participa en la inducción de la apoptosis, contribuirá con el conocimiento de sus estrategias replicativas y podría coadyuvar con el control de células resistentes a la apoptosis.

8. HIPÓTESIS

La expresión del ORF1 de FCV contribuye con la inducción de la apoptosis.

9. OBJETIVO GENERAL

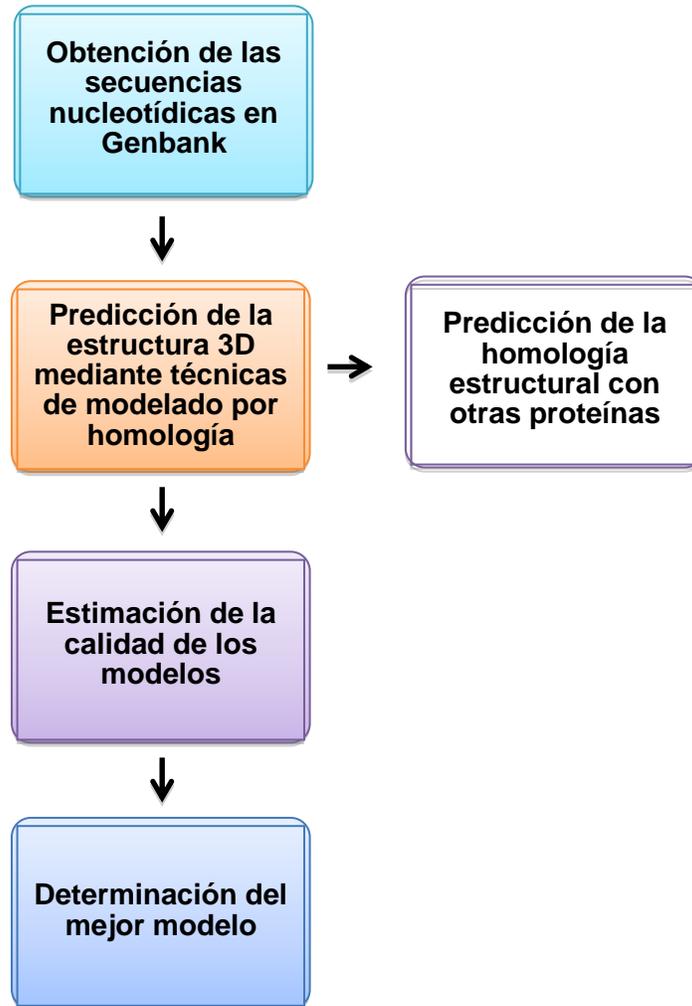
Determinar la inducción de la apoptosis mediante la expresión del ORF1 que codifica a las proteínas no estructurales de FCV.

10. OBJETIVOS PARTICULARES

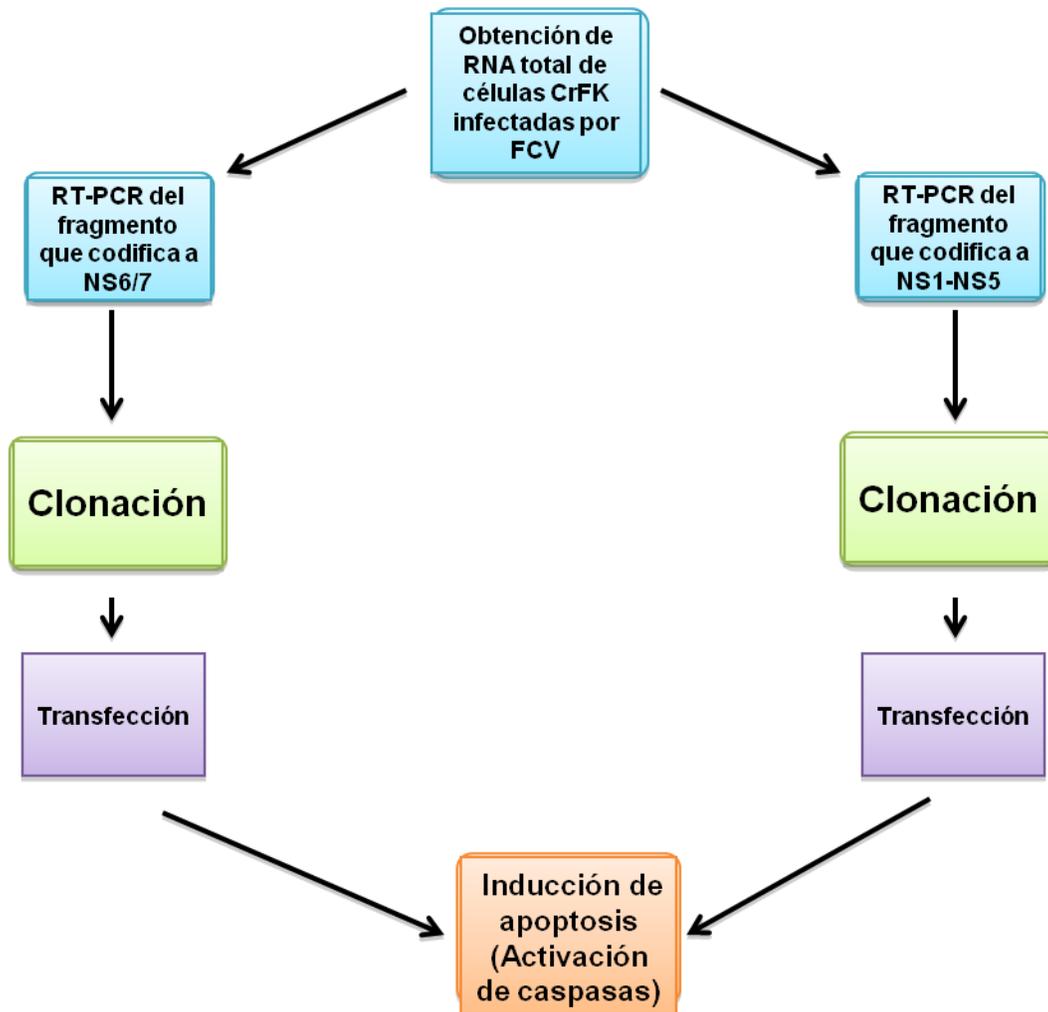
- 1) Predecir *in silico* la estructura tridimensional de las proteínas NS de FCV.
- 2) Analizar la homología estructural de las proteínas NS de FCV con otras proteínas conocidas.
- 3) Determinar si la proteína NS6/7 induce apoptosis.
- 4) Determinar si la expresión del fragmento del ORF1 que codifica a las proteínas NS1-NS5 participa en la inducción de la apoptosis.

11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Predicción de las estructuras 3D de las proteínas NS



Clonación de los fragmentos codificantes a NS1-5 y NS6/7



12. MATERIALES Y MÉTODOS

12.1 Predicción de las estructuras 3D de las proteínas NS

12.1.1 Obtención de las secuencias de las proteínas NS

La secuencia nucleotídica del genoma de FCV cepa F9, fue obtenida del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con el código de acceso M86379. Posteriormente, se realizó la traducción del ORF1 por medio del programa CLC Main Workbench 6. 8. 1. La determinación de la secuencia de las proteínas NS fue realizada con los datos reportados de los sitios de escisión de la poliproteína por la proteasa-polimerasa NS6/7 (Sosnovtsev *et al.*, 2002; Seal *et al.*, 1993; Furman *et al.*, 2009).

12.1.2 Predicción de las estructuras 3D y homologías estructurales

La predicción fue realizada con el servidor I-TASSER (Roy *et al.*, 2010). En este método, las secuencias de las proteínas diana, son comparadas con una librería de estructuras desde la base de datos del Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al.*, 2000). Este programa permite buscar los posibles plegamientos mediante diversos algoritmos de comparación de secuencias.

Las predicciones de los moldes de unión a ligando fueron calculadas con el algoritmo COACH de I-TASSER.

12.1.3 Análisis de los modelos obtenidos con I-tasser

El análisis de los modelos 3D predichos por I-TASSER, fue realizado con los algoritmos QMEAN6 (<https://swissmodel.expasy.org/>) y plots de Ramachandran en el servidor RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

12.2 Clonación de los fragmentos codificantes a NS1-5 y NS6/7

12.2.1 Cultivo celular y título viral

Línea celular CrFK

Las células CrFK fueron sembradas en medio mínimo esencial de Eagle con solución de sal balanceada de Earle (BSS) y L-glutamina modificada al 2 mM (EMEM) por ATTC, con lo cual se obtuvieron los siguientes compuestos y concentraciones: piruvato de sodio al 1.0 mM, aminoácidos no esenciales al 0.1 mM y 1.5 g/l de bicarbonato de sodio. El medio fue suplementado con suero fetal bovino al 10%, 5000 U de penicilina y 5 g/ml de estreptomicina. Las células se incubaron a 5% de CO₂ a 37°C. La infección de las células CrFK para su uso como control positivo se llevó a cabo con la cepa viral F9 de FCV.

Línea celular HEK293T

Esta línea celular fue sembrada en medio DMEM, suplementado con L-glutamina 4 mM y suero fetal bovino al 10%, 100U/ml de penicilina y 100U/ml de estreptomicina. Estas células se incubaron a 5% de CO₂ a 37°C.

12.2.2 Aislados bacterianos y plásmidos

Las bacterias competentes usadas para la transformación de los plásmidos recombinantes fueron la DH5 α y XL10-Gold de *Escherichia coli*. El plásmido elegido para clonar la región codificante a NS1-NS5, corresponde al pAmCyan1-N1, el cual expresa una proteína reportera color cian. Para el fragmento que codifica la proteína NS6/7, se eligió el vector de expresión pDsRed2-N1, el cual expresa una proteína reportera color rojo.

12.2.3 Selección de los sitios de restricción y diseño de oligonucleótidos iniciadores

La secuencia nucleotídica del ORF1 de FCV perteneciente al aislado viral F9, fue obtenida en la base de datos del GenBank con el código de acceso M86379. Por medio del “software SerialCloner 2.6.1” (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html), se investigaron los sitios de restricción presentes en el vector de expresión y ausentes en la secuencia que codifica a NS1-NS5, con el fin de definir a las enzimas de restricción candidatas a ser utilizadas para realizar la clonación de la región codificante al fragmento NS1-5, las cuales fueron *KpnI* para el extremo 5' y *AgeI* para el 3' (Tabla I).

Tabla I. Oligonucleótidos iniciadores de la región codificante a la proteína NS1-5

Nombre del oligonucleótido iniciador	Sitios de restricción	Oligonucleótido iniciador	Posición en el ORF1	Producto amplificado esperado
FW F9_1	<i>KpnI</i>	5'- CCC GGT ACC ATG TCT CAA ACT CTG AGC TTC GTG C -3'	20-44	3233 pb
RV F9_3213	<i>AgeI</i>	5'-CGG ACC GGT CCT TCC TCA GCA AAG CTG ACG -3'	3214-3232	

Así mismo, los oligonucleótidos iniciadores correspondientes al fragmento que codifica a la proteasa-polimerasa NS6/7, fueron diseñados con los sitios de restricción *HindIII* en el extremo 5' y *EcoRI* en el 3' determinados con el uso de los parámetros anteriormente descritos (Tabla II).

Tabla II. Oligonucleótidos iniciadores de la región codificante a la proteína NS6/7

Nombre del oligonucleótido iniciador	Sitios de restricción	Oligonucleótido iniciador	Posición en el ORF1	Producto amplificado o esperado
FW F9_red	<i>HindIII</i>	5'- AAG CTT CAG GAC CAG GCA CCA AG-3'	3233-3250	2085 pb
RV F9_red	<i>EcoRI</i>	5'- GAA TTC AAC TTC GAA CAC ATC ACA GTG -3'	5288-5308	

Todos los oligonucleótidos iniciadores se diseñaron manualmente y fueron rectificadas con el programa CLC Main Workbench (<http://www.clcbio.com/products/clc-main-workbench>), verificando que éstos se encontrasen en marco de lectura +1 con el vector de expresión.

12.2.4 Extracción de RNA totales

Siete millones de células infectadas por FCV F9 fueron homogenizadas con TriZol en una proporción de 50 a 100 mg de células por 1 ml de TriZol. Posteriormente, la mezcla se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se agregaron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de TriZol. Los tubos se agitaron suavemente por 15 segundos (s) y se incubaron a temperatura ambiente por 2 ó 3 minutos (min). A continuación, la mezcla se centrifugó a 12, 000 x g por 15 min a 4°C. La fase acuosa se mezcló con isopropanol por cada ml de TriZol usado, se incubó a 4°C por 10 min a 12, 000 x g, el sobrenadante se removió y se agregó etanol al 75%, el cual fue removido mediante centrifugación y decantación. Finalmente, el RNA se resuspendió en agua libre de RNasas.

12.2.5 Síntesis del cDNA y purificación del producto de PCR

La síntesis del cDNA fue realizada con el kit de síntesis de cDNA SCRIPT (Jena Bioscience). Brevemente, se realizó una reacción con 300 ng de oligo-dT y 100 ng de RNA aforada a 20 µl con agua libre de RNasas, posteriormente, se incubó a 65°C por 5min y se realizó una incubación en hielo. El segundo paso de esta reacción, consistió en agregar 4 µl del amortiguador completo SCRIPT RT 5x, dNTP's 500 µM, solución DTT 5 mM, 40 unidades de inhibidor de RNasas y 100 unidades de Transcriptasa Reversa SCRIPT. Esta mezcla fue aforada a 40 µl con agua libre de RNasas, posteriormente, se incubó a 42°C por 10 min, seguido de una incubación por 60min a 50°C.

Mediante PCR punto final, se obtuvieron los amplicones del fragmento codificante a NS1-5 y NS6/7. Las reacciones fueron realizadas con 5 μ l de amortiguador de Alta Fidelidad 10x, 200 μ M de dNTP's, 0.5 μ M de cada oligonucleótido iniciador, 50 ng del DNA molde y 1.25 unidades de la DNA polimerasa de alta fidelidad (Jena Bioscience). El programa de amplificación de los fragmentos codificantes a NS1-5 y NS6/7, se muestran en las Tablas III y IV.

Tabla III. Programa de amplificación del fragmento codificante a NS1-5

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	2 min
35 ciclos	94°C	30 s
	56°C	30 s
	72°C	3.5 min
Extensión final	72°C	2 min

Tabla IV. Programa de amplificación del fragmento codificante a NS6/7

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	2 min
35 ciclos	94°C	30 s
	63°C	30 s
	72°C	2 min
Extensión final	72°C	2 min

La purificación del producto de PCR se llevó a cabo mediante el kit de purificación de DNA en gel de agarosa "QIAquick Gel Extraction" (Qiagen, Amersham) siguiendo la metodología especificada por el fabricante.

12.2.6 Clonación del fragmento purificado en vectores de tránsito

El fragmento que codifica a las proteínas NS1-5 fue clonado en los vectores de tránsito pJET1.2 (Thermo Scientific, EU) y pCR™4-TOPO (Thermo Fisher Scientific, EU). El fragmento que codifica a NS6/7 fue clonado en el vector pCR™4-TOPO. La clonación fue realizada con productos de PCR amplificados con los oligonucleótidos específicos para el fragmento que codifica a las proteínas NS1-5 y NS6/7, el protocolo de ligación que fue llevado a cabo, es el sugerido por el manual de los vectores de tránsito ya mencionados.

12.2.7 Subclonación del fragmento purificado en el vector de expresión

La subclonación del fragmento que codifica a las proteínas NS6/7 en el vector pDsRed2-N1 y NS1-5 en el vector pAmCyan1-N1, fue realizada mediante la doble restricción de dichos vectores con las enzimas elegidas para realizar la clonación dirigida (Tablas I y II). En seguida, se realizó la liberación del inserto de los vectores de tránsito recombinantes que contienen a los fragmentos que codifican a NS1-5 y NS6/7. La doble restricción del vector de tránsito y el vector de expresión fue analizada por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% p/v, el tamaño de los productos requeridos fue calculado mediante marcadores de peso o tamaño molecular y pares de bases, posteriormente, las bandas correspondientes a los pesos requeridos, fueron cortadas y purificadas con el kit de purificación de DNA Quiagen (Amersham). Una vez obtenido el vector de expresión lineal y el inserto purificado, se realizaron ligaciones con las siguientes proporciones molares vector-inserto: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 y 1:6. La reacción de ligación fue llevada a cabo con 1 µl de T4 DNA ligasa (Invitrogen) en una reacción de 20 µl durante 16 h a 16°C.

12.2.8 Transformación de las bacterias competentes con los plásmidos de interés

12.2.8.1 Obtención de células competentes

Las células competentes *E. coli* DH5 α y XL10-Gold fueron obtenidas de la siguiente manera: se sembró una colonia de las bacterias competentes en 50 ml de medio SOB (Tryptona al 2% p/v, extracto de levadura al 0.5% p/v, NaCl 8.56 mM y KCl 2.5mM), la cual fue incubada hasta obtener una absorbancia entre 0.4 y 0.6. Posteriormente, el cultivo líquido se centrifugó a 4000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 8 ml de amortiguador FSB (Acetato de potasio pH 7.5 10mM, MnCl₂ 45mM, CaCl₂ 10mM, KCl 100mM, Hexaaminocobalto 3mM y Glicerol al 10%), en seguida, fueron añadidos 70 μ l de DMSO y se incubó por 5 min a 4°C, finalmente, se realizaron alícuotas almacenadas a -80°C.

12.2.8.2 Protocolo de transformación por choque térmico

La transformación de las bacterias competentes con los vectores recombinantes, se realizó agregando 2 μ l de la mezcla de ligación a 100 μ l del cultivo de las bacterias competentes, en seguida, la mezcla se incubó por 30 min a 4°C. Posteriormente, se indujo un choque térmico colocando el tubo con la mezcla de las bacterias y los plásmidos de interés a 42°C por 90 s, posteriormente se realizó una incubación a 4 ° C por 2 min. El paso siguiente consistió en colocar toda la mezcla a 925 μ l de medio SOC (medio SOB suplementado con MgCl₂ 10mM y Glucosa 20mM) y ésta se incubó a 37°C a 250 rpm en agitación constante por 1h. El cultivo anterior descrito, fue sembrado en medio sólido LB suplementado con ampicilina como antibiótico de resistencia para el vector pJET1.2 y kanamicina para los vectores pCRTM4-TOPO, pDsRed2-N1 y pAmCyan1-N1. En seguida, las placas fueron incubadas a 37°C por 18 h. Las colonias obtenidas del crecimiento, fueron resembradas en una caja Petri muestra con LB sólido y, cada una de las

clonas, se enumeró para su identificación y análisis posterior mediante restricción y PCR punto final.

12.2.8.3 Purificación del DNA plasmídico mediante el método de lisis por ebullición (Boiling lysis)

Para aislar el DNA plasmídico de las clonas, una colonia de las bacterias transformadas y crecidas en medio LB sólido de la caja muestra, fue sembrada en medio LB líquido suplementado con el antibiótico de resistencia, posteriormente, este cultivo fue incubado por 16 h a 37°C con una agitación constante de 250 rpm. Después, el cultivo se centrifugó a 13, 000 rpm por 3 min para obtener un pellet bacteriano, el cual fue resuspendido en 330µl de la solución STET (sacarosa 8%, Tritón X-100 0.1%, EDTA 50mM y Tris-HCl 50mM). Posteriormente, se agregaron 24 µl de lisozima al 10% a la mezcla anterior y se agitó vigorosamente, enseguida, se hirvió el tubo por 2min y se centrifugó a 13, 000 rpm por 5 min, de esta manera se obtuvo un precipitado que fue retirado del tubo, al líquido restante que contiene el DNA plasmídico, se le agregó isopropanol y se centrifugó nuevamente para obtener una pastilla que fue secada y resuspendida en agua estéril libre de nucleasas.

12.2.9 Transfección en células CrFK

Se agregaron 5 µl de lipofectamina (Invitrogen) a 100 µl de medio opti-MEM; por otro lado, se colocaron 3.5 µg de DNA plasmídico recombinante a 100 µl de medio opti-MEM, posteriormente, el contenido del tubo con la mezcla del DNA plasmídico, fue agregado lentamente al tubo con lipofectamina, se mezcló cuidadosamente y se incubó por 15 min para permitir la formación de liposomas. Como controles, se generó una reacción sin DNA plasmídico y otra sin DNA plasmídico ni lipofectamina. Posteriormente, fue retirado el medio de cultivo de células CrFK o HEK293T sembradas en una multiplaca de seis pozos a una confluencia entre el 70% y 90%, para realizar dos lavados con 800 µl de opti-MEM

por cada pozo, enseguida se agregó el contenido de los tubos a la placa de 6 pozos y se incubó a 37°C por 5 h a 5% de CO₂, al término de la incubación, se agregó 1 ml de medio completo en cada pozo. Después de 48 h, las células fueron observadas por microscopía de fluorescencia y éstas fueron colectadas para su posterior análisis.

El efecto citopático se determinó por microscopía de campo claro, 24 y 48 h después de la transfección mediante la detección visual de la pérdida de refringencia, destrucción de la monocapa, cambio de la morfología celular y formación de agrupaciones celulares.

12.2.10 Extracción de proteínas, Western blot y electroforesis SDS-PAGE

Para la extracción de proteínas totales, las células transfectadas fueron cultivadas entre un 80 y 90% de confluencia en placas de Petri de 100mm. Se agregaron 15 µl de buffer de proteínas (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1 % p/v) para obtener un extracto de proteínas totales que fueron desnaturalizadas a 96°C en bloque térmico por 10 min. Posteriormente, fueron separadas electroforéticamente en una cámara Bio Rad (Mini PROTEANT Tetra System) por SDS-PAGE al 15%(Acrilamida-Bisacrilamida 30%- 0.8%, 0.375M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% persulfato de amonio y TEMED) con tampón de corrida Tris-Glicina-SDS (25mM/190mM/SDS 0.05%). A continuación, se realizó la transferencia a una membrana de PDVF de 0.45nm (Perkin Elmer) en una cámara húmeda (Bio-Rad). La membrana se bloqueó por una hora con una solución al 5% de leche descremada en TBS (Tris 10 Mm pH 7.5, NaCl 100 mM) suplementado con 1% de Tween20 en agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó por 18 h a 4°C en agitación constante con el anticuerpo primario anti-NS7 en una dilución 1:7000 de anticuerpo-leche al 5%. Para determinar el control de carga, la región de la membrana correspondiente a 45 kDa, fue incubada con anticuerpo anti-actina (1:1000, anticuerpo-leche 1%). Enseguida, las membranas fueron lavadas

por 10 min, 5 veces con TBS-Tween y se incubaron a temperatura ambiente y en agitación con el anticuerpo secundario por 1.5 h. Para el anticuerpo anti-NS7, se usó anticuerpo secundario anti-conejo y, el anticuerpo secundario empleado para la anti-actina, fue un anticuerpo anti-ratón. Luego de 5 lavados con TBS 1x por 10 min, las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia (Super Signal West Pico/Femto Chemiluminiscent Substrate de Thermo Scientific; ChemiDoc MP Imaging System).

13. RESULTADOS

13.1 Predicción de la estructura 3D y validación de los modelos calculados

Los modelos 3D de las proteínas NS fueron predichos usando un programa de construcción de modelos por homología, I-TASSER y los gráficos moleculares obtenidos fueron visualizados con el programa UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>). La secuencia de cada proteína estructural, fue introducida completamente en el programa I-TASSER, no se analizó la secuencia de la proliproteína sin escindir. Para cada proteína NS analizada por el programa, se obtuvieron cinco modelos, los cuales fueron validados con los algoritmos QMEAN6 y gráficos de Ramachandran para determinar el modelo más estable; los valores para cada modelo, se encuentran descritos en la Tabla V. Los criterios de selección de los modelos predichos, fueron aquellos que presentaron valores de QMEAN6 cercanos a 1 y que tuviesen el mayor porcentaje de residuos en la región favorecida y la región permitida en los gráficos de Ramachandran. Con base a los datos obtenidos, de los cinco predichos, se eligió al modelo 1 para las proteínas NS1, NS3 y NS6/7 y al modelo 2 para las proteínas NS2, NS4 y NS5 (Figura 5).

Tabla V. Valores QMEAN6 y Gráficos de Ramachandran

Proteína	Peso molecular	Modelo	Gráficos de Ramachandran			QMEAN6
			Residuos en la región favorecida	Residuos en la región permitida	Residuos fuera de la región	
NS1	5.6 kDa	Modelo 1	86.40%	11.40%	2.30%	0.706
		Modelo 2	59.10%	29.50%	11.40%	0.556
		Modelo 3	72.70%	18.20%	9.10%	0.528
		Modelo 4	84.10%	9.10%	6.80%	0.55
		Modelo 5	77.30%	20.50%	2.30%	0.314
NS2	32 kDa	Modelo 1	39.20%	28.30%	32.50%	0.117
		Modelo 2	64.70%	21.20%	14.10%	0.372
		Modelo 3	57.60%	22.30%	20.10%	0.192
		Modelo 4	64.00%	20.50%	15.50%	0.312
		Modelo 5	58.70%	24.70%	16.60%	0.237
NS3	39 kDa	Modelo 1	74.70%	17.60%	7.70%	0.358
		Modelo 2	70.70%	19.60%	9.70%	0.253
		Modelo 3	76.40%	15.90%	7.70%	0.24
		Modelo 4	81.80%	12.20%	6.00%	0.303
		Modelo 5	69.90%	19.90%	10.20%	0.245
NS4	30 kDa	Modelo 1	56.80%	26.00%	17.20%	0.229
		Modelo 2	62.60%	26.70%	10.60%	0.342
		Modelo 3	64.10%	22.00%	13.90%	0.284
		Modelo 4	64.80%	23.80%	11.40%	0.315
		Modelo 5	57.50%	23.10%	19.40%	0.52
NS5	13 kDa	Modelo 1	70.60%	15.60%	13.80%	0.258
		Modelo 2	75.20%	13.80%	11.00%	0.365
		Modelo 3	58.70%	27.50%	13.80%	0.315
		Modelo 4	70.60%	13.80%	15.60%	0.246
		Modelo 5	61.50%	19.30%	19.30%	0.316
NS6/7	76 kDa	Modelo 1	56.10%	24.20%	19.70%	0.441
		Modelo 2	59.00%	22.10%	18.90%	0.437
		Modelo 3	59.90%	22.80%	17.30%	0.372
		Modelo 4	56.20%	23.20%	20.50%	0.323
		Modelo 5	58.00%	22.60%	19.40%	0.425

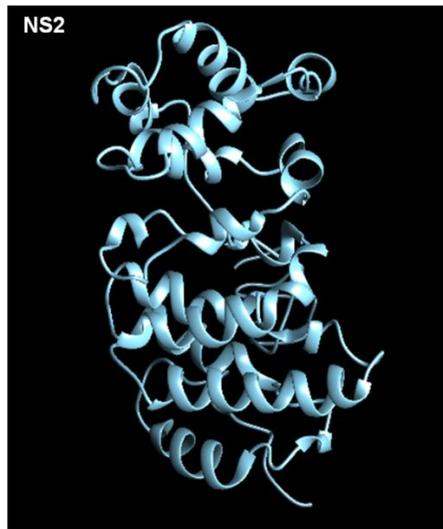
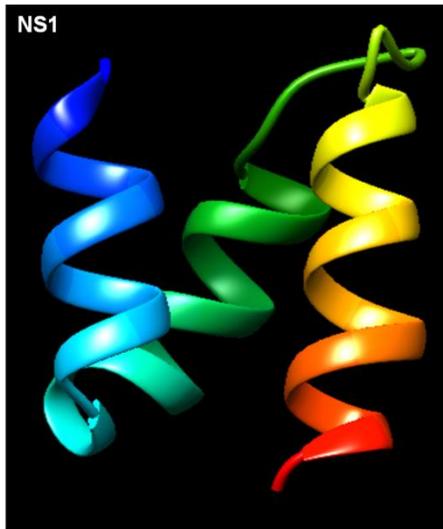


Figura 5. Predicción de la estructura tridimensional de las proteínas NS de FCV. Se muestran las estructuras tridimensionales de las proteínas NS1 a NS6/7 predichas por el programa I-TASSER y validadas con los valores QMEAN6 y gráficos de Ramachandran.

13.2 Predicción de función

Mediante el algoritmo COACH, se predijeron los posibles ligandos de las proteínas NS mediante homología estructural con otras proteínas de la base de datos PDB. El criterio de selección de las proteínas homólogas, fue el valor C-score que indica el grado de confianza de la predicción, en la cual, aquellas predicciones con los c-score más cercanos a 1, son las más exactas. También se reportan las proteínas estructuralmente más cercanas a las proteínas NS con los valores de TM-score, la cual es una medida métrica de la similitud estructural entre dos proteínas, en las cuales, los valores más cercanos a 1, indican un perfecto empalme entre las dos secuencias. En la Tabla VI, se registran las proteínas con segmentos o dominios estructuralmente cercanos a las proteínas NS de FCV y, en la Tabla VII, se muestran las proteínas molde del algoritmo COACH.

Tabla VI. Predicción de función de las proteínas NS

	Código PDB	Proteína	Especie	Clasificación	C-score
NS1	1ea4J	Represor transcripcional CopG	<i>Streptococcus</i> spp	Regulación genética	0.12
	4h10A	Dominio hélice-bucle-hélice del complejo CLOCK-BMAL1	<i>Homo sapiens sapiens</i>	Transcripción	0.10
NS2	2y50B	Colagenasa G	<i>Clostridium histolyticum</i>	Hidrolasa	0.03
	2w6dB	Tubo lipídico de la dinamina-like	<i>Nostoc punctiforme</i>	Hidrolasa	0.03
NS3	2ce7C	Proteasa integral de membrana dependiente de ATP	<i>Thermotoga maritima</i>	Proteasa	0.73
NS4	3dhcA	N-Acil Homoserina Lactona Hidrolasa	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Hidrolasa	0.11
NS5	4n07B	Dominio de unión a ligando GluA2	<i>Rattus Norvegicus</i>	Proteína de membrana	0.09
	5dggA	Dominio central de la proteína Lpg1148	<i>Legionella pneumophila</i>	Función desconocida	0.05
NS6/7	4k4yA	Polimerasa B3	Coxsackievirus	Transferasa	0.14
	2ilyA	Polimerasa	Poliovirus	Trasnferasa	0.07

Tabla VII. Moldes de las proteínas estructuralmente homólogas a las proteínas NS

	PDB	Proteína	Especie	Clasificación	TM-score
NS1	1fpo	Chaperona tipo j	<i>Escherichia coli</i>	Chaperona	0.668
NS2	4f4ca	Transportador multifármaco	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Transportador de proteínas	0.511
	2w6dA	Dinamina-like	<i>Nostoc punctiforme</i>	Hidrolasa	0.483
	3g61A	Glicoproteína P	<i>Mus musculus</i>	Proteína de membrana	0.482
NS3	3cf1B	Proteína P97/vcp	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	Proteína de transporte	0.930
	5g4fA	Proteína tipo ATPasa que contiene valosina	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	Hidrolasa	0.802
NS4	2r2dA	Lactonasa "quorum-quenching"	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Hidrolasa	0.708
	3ai0A	Beta glucosidasa	<i>Clostridium cellulovorans</i>	Hidrolasa	0.639
NS5	2n4hA 2pi4A 5fb1A	Proteína TDP-43	<i>Homo sapiens sapiens</i>	Proteína de unión al DNA	0.588
		RNA polimerasa dirigida por DNA	FagoT7	Transferasa de DNA	0.482
		Dedos PHD del autoantígeno Sp100C	<i>Homo sapiens sapiens</i>	Proteína estructural de transcripción	0.478
NS6/7	2ijd1	Precursor de la proteína 3CD	Poliovirus	Transferasa hidrolasa	0.869
	1khvB	Polimerasa de RNA dependiente de RNA	Virus hemorrágico del conejo	Transferasa	0.686

La proteína con segmentos o dominios estructuralmente cercanos a la proteína NS1 determinados por el programa I-TASSER, fue una chaperona tipo J de *E. coli* (código PDB: 1fpoA2). Con respecto a las predicciones del ligando obtenidas con el algoritmo COACH, que son determinadas mediante la comparación estructural de la proteína en estudio con la base de datos del PDB, se obtuvo que los moldes computados para la proteína NS1 fueron el represor transcripcional CopG de *Streptococcus* spp (código PDB: 1ea4J) con unión al DNA, así como los dominios hélice-bucle-hélice del complejo CLOCK-BMAL1 de humano (código PDB: 4h10A) con unión a DNA. Con respecto a la proteína NS2, se determinó que los

polipéptidos o secciones de las proteínas estructuralmente cercanas a ésta, fueron el transportador multi-fármaco de *Caenorhabditis elegans* (código PDB: 4f4ca); una dinamina like de *Nostoc punctiforme* (Código PDB: 2w6dA) y una glicoproteína P de *Mus musculus* (código PDB: 3g61A). Las proteínas molde determinadas por COACH para la predicción del ligando, poseen C-score de 0.03, lo cual indica poca confiabilidad.

Así mismo, se encontraron los siguientes péptidos o secciones de proteínas cercanas estructuralmente a NS3: proteína P97/vcp (código PDB: 3cf1B) con unión a ADP, así como la proteína tipo ATPasa que contiene valosina de *Thermoplasma acidophilum* (código PDB: 5g4fA). Las proteínas molde para la predicción del ligando, presentaron un C-score menor a 0.02, excepto la proteasa integral de membrana dependiente de ATP de *Thermotoga maritima* (código PDB: 2ce7C), con un C-score de 0.73.

Los moldes estructuralmente cercanos a la proteína NS4 fueron la lactonasa “quorum-quenching” de *Agrobacterium tumefaciens* (código PDB: 2r2dA) y la beta-glucosidasa de *Clostridium cellulovorans* (código PDB: 3ai0A). El modelo de predicción de ligando con el C-score más alto, fue la N-Acil Homoserina Lactona Hidrolasa de *Bacillus thuringiensis* (código PDB: 3dhcA), que hidroliza la N-acil-l-homoserina lactona.

Para la proteína NS5, se obtuvieron las siguientes proteínas con segmentos cercanos estructuralmente a ésta: la proteína TDP-43 de unión a DNA/RNA de humano (código PDB: 2n4hA), la RNA polimerasa dirigida por DNA del fago T7 (código PDB: 2pi4A) y los dedos PHD del autoantígeno Sp100C de humano (código PDB: 5fb1A). Los modelos de predicción del ligando predichos por COACH tuvieron un C-score bajo, por lo tanto no se consideraron en este estudio.

Los segmentos cercanos estructuralmente a la proteína NS6/7 fueron el precursor de la proteína 3CD de poliovirus (código PDB: 2ijd1) y la polimerasa de RNA

dependiente de RNA del virus RdRP (código PDB: 1khvB). Los modelos de predicción del ligando fueron la polimerasa B3 del Coxsackievirus (código PDB: 4k4yA) y la polimerasa de poliovirus (código PDB: 2ilyA) ambas con unión al RNA.

13.3 Clonación del fragmento codificante a NS1-5 en el vector de expresión pAmCyan1-N1

13.3.1 Clonación en los vectores de tránsito pCR 4-TOPO y pJET1.2

Primeramente, se extrajo el RNA de células CrFK infectadas con FCV F9 y se realizó una RT-PCR con los oligonucleótidos iniciadores FW F9_1 y RV F9_3213 para amplificar la región codificante a las proteínas NS1-5 (Figura 6). Debido a que no se observaron bandas inespecíficas en el análisis por electroforesis en geles de agarosa, se realizó la clonación de este fragmento en los vectores de tránsito pCR 4-TOPO y pJET1.2 con el uso del producto de PCR sin purificar, los plásmidos recombinantes fueron llamados pCR 4-TOPO-NS1-5 y pJET1.2-NS1-5. Se obtuvieron siete clones del plásmido pJET1.2-NS1-5 (Figura 7) y ocho del pCR 4-TOPO-NS1-5 (Figura 10), la presencia del inserto en los plásmidos recombinantes, fue analizada mediante la extracción del DNA plasmídico de las clones obtenidas para su uso como molde en una PCR punto final con los oligonucleótidos iniciadores FW F9_1 y RV F9_3213, como control positivo, se usó cDNA de células infectadas por FCV F9. Para corroborar los datos obtenidos en la PCR punto final, se realizó una doble restricción con las enzimas *KpnI* y *AgeI*.

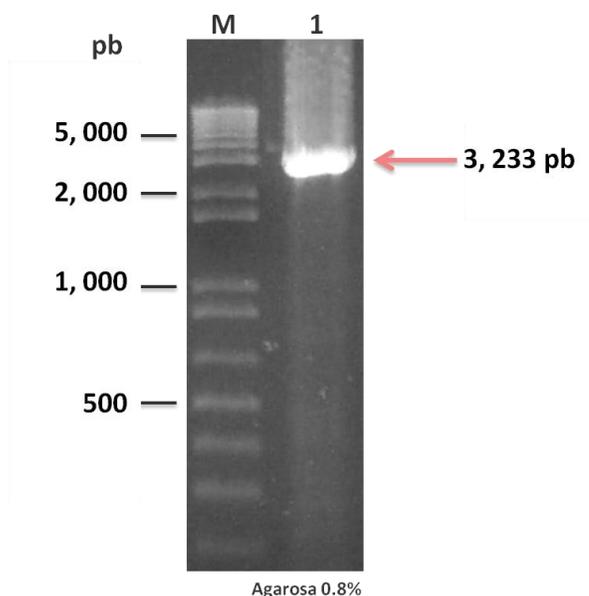


Figura 6. Amplificación del fragmento codificante a NS1-5 mediante PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) que muestra la amplificación del fragmento codificante a NS1-5, con un tamaño de 3,233 pb mediante RT-PCR del RNA de células CrFK infectadas. El marcador de tamaño molecular está señalado con la letra M.

Se eligieron las clonas 1, 2 y 4 del plásmido pJET1.2-NS1-5 para realizar la PCR, en las cuales se obtuvo la banda esperada de 3,233 pb correspondiente al fragmento que codifica a NS1-5 (Figura 8). La doble restricción fue realizada con el DNA plasmídico de la clona 1 de pJET1.2-NS1-5, en la cual se obtuvo el inserto esperado de 3,233 pb que corresponde a NS1-5 y la banda del vector pJET1.2 que posee un tamaño de 2,974 pb (Figura 9).

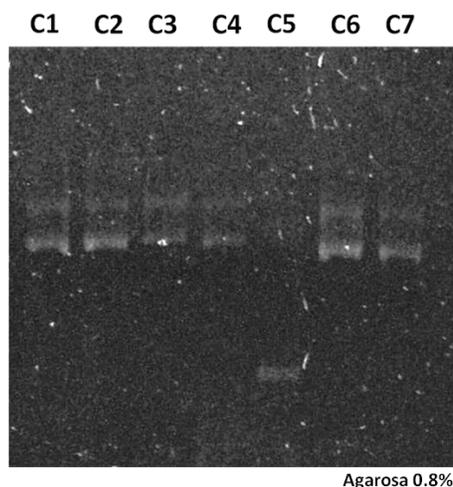


Figura 7. DNA plasmídico de las clonas obtenidas del vector pJET1.2-NS1-5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) que muestra el DNA de las siete clonas (C) pJET1.2-NS1-5.

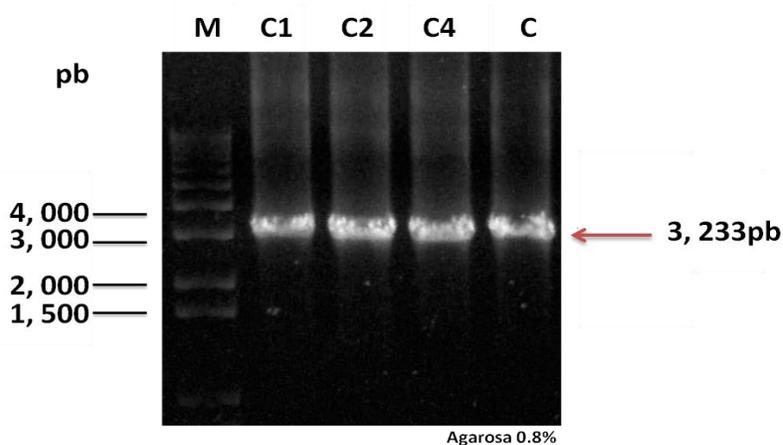


Figura 8. Amplificación por PCR del fragmento codificante a NS1-5 del plásmido pJET1.2-NS1-5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) que muestra la amplificación del fragmento de 3, 233 pb correspondiente al cDNA de NS1-5 de las clonas 1, 2 y 4. El marcador de tamaño molecular se encuentra señalado con la letra M y en el control positivo indicado con la letra C en el último carril, se observa una banda correspondiente a la amplificación del fragmento codificante a NS1-5 de células CrFK infectadas por FCV F9.

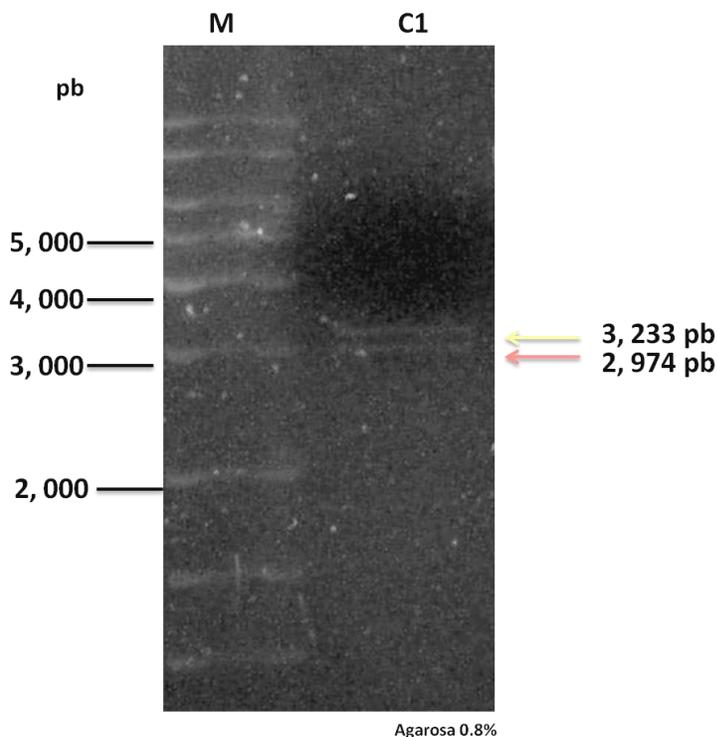


Figura 9. Doble restricción del plásmido pJET1.2-NS1-5. El cDNA de la clona 1 pJET1.2-NS1-5 se sometió a una doble restricción con las enzimas *KpnI* y *AgeI*. La flecha verde indica la banda correspondiente al inserto NS1-5 con un tamaño de 3, 233 pb y la flecha roja, indica la banda correspondiente al vector pJET1.2 lineal, con un tamaño de 2,974 pb.

El DNA de las ocho clonas obtenidas en la transformación de la ligación del vector pCR 4-TOPO-NS1-5 fueron analizadas por PCR punto final, todas éstas presentaron la banda esperada de 3,233 pb correspondiente a NS1-5 (Figura 11). Posteriormente, se realizó la doble restricción del DNA plasmídico de la clona 1, mediante la cual se registró el inserto esperado de 3,233 pb que corresponde al fragmento codificante a NS1-5 y la banda específica del vector pCR 4-TOPO de 3, 900 pb (Figura 12).

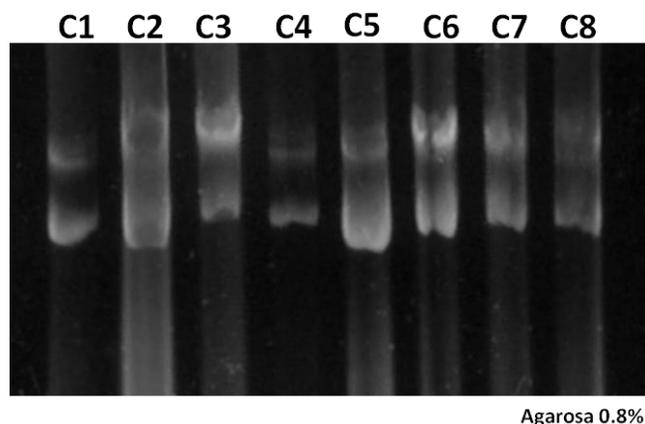


Figura 10. DNA plasmídico de las clonas obtenidas del vector pCR 4-TOPO-NS1-5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) del cDNA de las ocho clonas (C1-C8) obtenidas en la transformación de *E. coli* DH5 α con la ligación del vector pCR 4-TOPO con el producto de PCR de la región codificante a NS1-5.

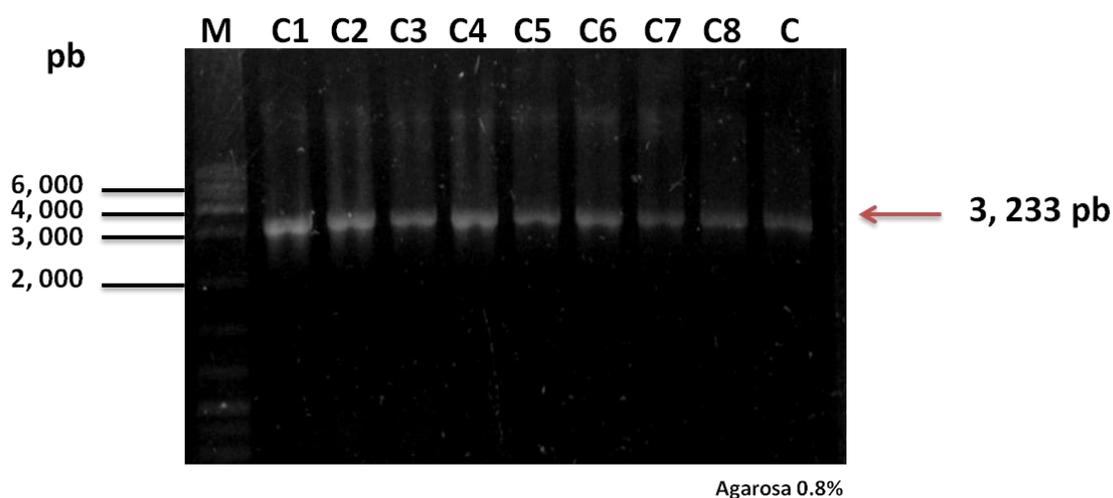


Figura 11. Amplificación por PCR del fragmento codificante a NS1-5 del plásmido pCR 4-TOPO-NS1-5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) que muestra la amplificación del fragmento codificante a NS1-5 de las ocho clonas (C1-C8) con el producto de PCR de la región codificante a NS1-5. El producto de amplificación es de 3,233 pb. El marcador de tamaño molecular se encuentra señalado con la letra M y en el control positivo indicado con la letra C en el último carril, se observa una banda correspondiente a la amplificación del fragmento codificante a NS1-5 de células CrFK infectadas por FCV F9.

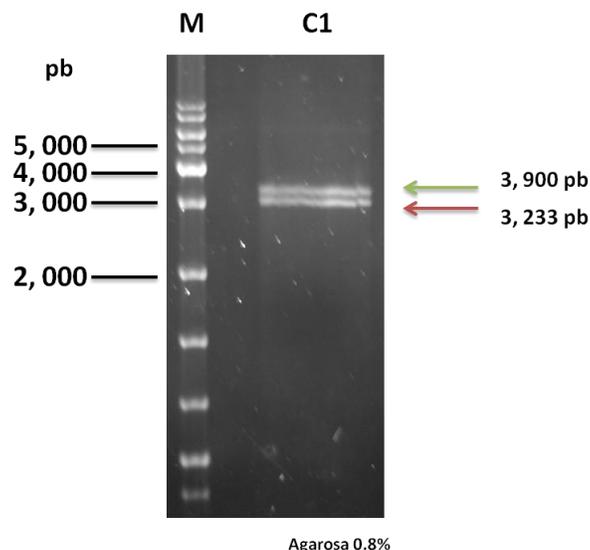


Figura 12. Doble restricción del plásmido pCR 4-TOPO-NS1-5. El cDNA de la clona 1 pCR 4-TOPO-NS1-5 se sometió a una doble restricción con las enzimas *KpnI* y *AgeI*. La flecha roja indica la banda correspondiente al inserto NS1-5 con un tamaño de 3, 233 pb y, la flecha verde, indica la banda correspondiente al vector pCR 4-TOPO-NS1-5 lineal, con un tamaño de 3, 900 pb. En el carril M, se muestra el marcador de tamaño molecular.

13.3.2 Secuenciación del vector pJET1.2-NS1-5

Una vez obtenido el amplicón de NS1-5 de las clonas 1 y 4, éstos se enviaron para su secuenciación en la Unidad de Secuenciación del Langebio, Cinvestav. Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación, fueron los empleados para amplificar este fragmento, por ende, sólo se obtuvieron las secuencias parciales de cada clona. El análisis de dichas secuencias, nos permitió confirmar que los insertos clonados corresponden a FCV, además, se encontraron mutaciones silenciosas en los nucleótidos 642 y 3810 (Figuras del apéndice A1y A2).

13.3.3. Subclonación en el vector de expresión pAmCyan1-N1

Una vez corroborado que la secuencia de NS1-5 no poseía mutaciones y que el vector transfectado producía la proteína cian, los plásmidos recombinantes pJET1.2-NS1-5 y pCR 4-TOPO-NS1-5 fueron sometidos a una doble restricción con las enzimas *AgeI* y *KpnI* para la obtención del inserto correspondiente a NS1-5. Así mismo, se llevó a cabo una doble restricción del vector pAmCyan1-N1 con las enzimas *AgeI* y *KpnI* para realizar la clonación dirigida del fragmento codificante a NS1-5 en el vector pAmCyan1-N1 (Figura 13).

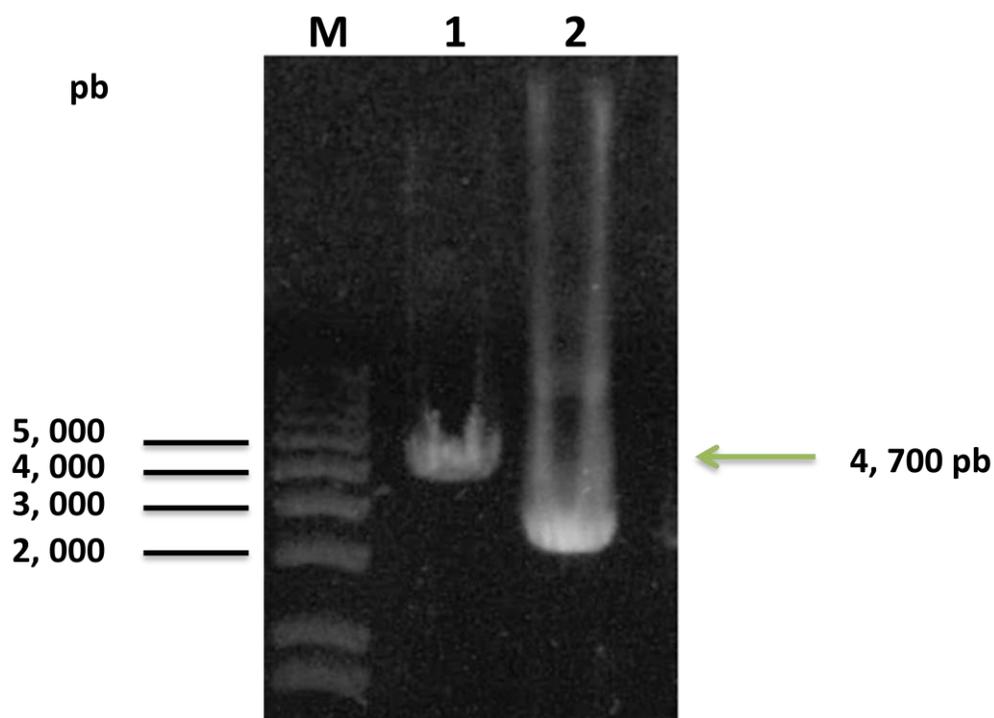


Figura 13. Doble restricción del plásmido pAmCyan1-N1. El DNA plasmídico del vector pAmCyan1-N1 se sometió a una doble restricción con las enzimas *KpnI* y *AgeI*. El carril 1 corresponde al plásmido lineal de 4,700 pb y, el carril 2, al plásmido circular.

Otra estrategia para realizar la subclonación de NS1-5 en el vector de expresión, fue el uso de las siguientes enzimas isoesquizoméricas: *Asp718* que sustituyó a *KpnI* y *CspAI* para sustituir a *AgeI*. El procedimiento anteriormente descrito fue

realizado con las enzimas substitutas y se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α y XL10-Gold con el producto de ligación, sin embargo, no se logró obtener el plásmido recombinante.

13.3.4 Transfección con lipofectamina del vector de expresión pAmCyan1-N1 en células CrFK

Por otro lado, se realizaron ensayos de transfección del vector pAmCyan1-N1 en células CrFK para estandarizar la técnica, el tiempo de expresión del mRNA correspondiente a la proteína bandera color cian, fue de 24 horas y la mayor expresión a nivel de proteína, fue en las células transformadas con una cantidad de 3mg del vector (Figura 14).

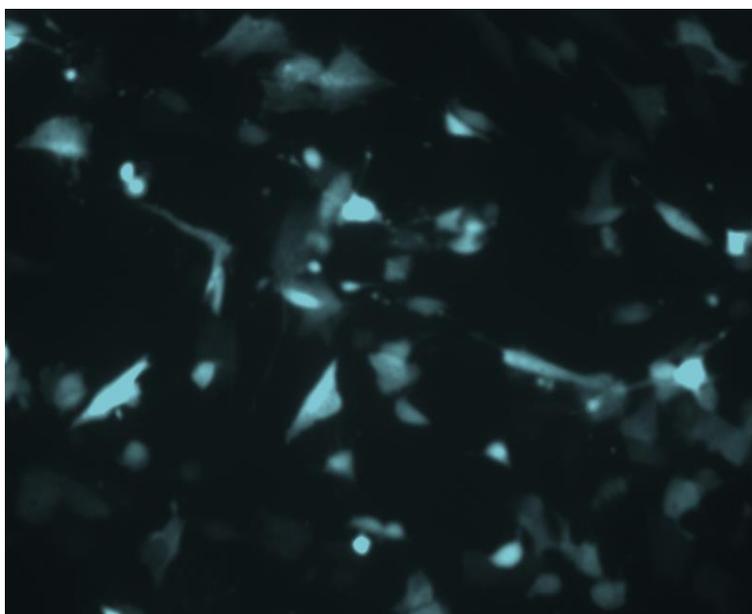


Figura 14. Transfección por lipofectamina del vector pAmCyan1-N1 en células CrFK. Microscopía de epifluorescencia de células CrfK transfectadas con 3mg del vector pAmCyan1-N1 a las 24 horas postransfección.

13.4 Clonación del fragmento codificante de NS6/7 en el vector de expresión pDsRed2-N1

13.4.1 Clonación en los vectores de tránsito pCR 4-TOPO y pJET1.2

Por otro lado, para la clonación de la región NS6/7, que contiene a la proteasa polimerasa del FCV, se realizó una RT-PCR con los oligonucleótidos iniciadores FW F9_red y RV F9_red para amplificar la región codificante a la proteína NS6/7. En el análisis por electroforesis en geles de agarosa, se observó únicamente la banda del tamaño esperado (Figura 15). Posteriormente, se realizó la clonación de este fragmento en el vector de tránsito pCR 4-TOPO con el uso del producto de PCR sin purificar, el plásmido recombinante fue nombrado pJET1.2-NS6/7.

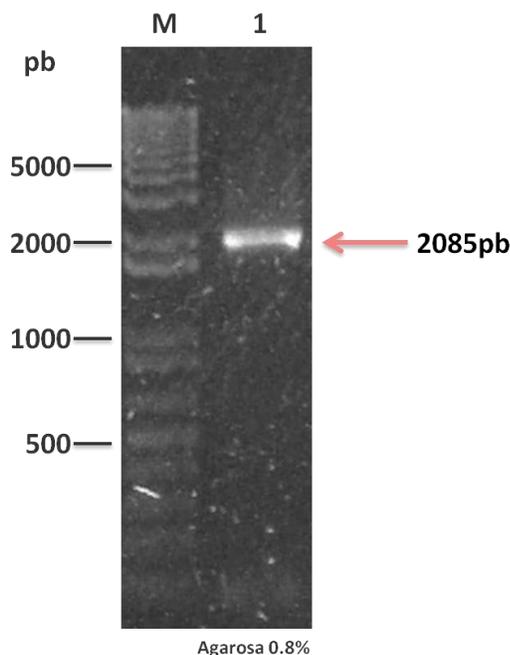


Figura 15. Amplificación del fragmento codificante a NS6/7 mediante PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) que muestra la amplificación del fragmento codificante a NS6/7, de 2085 pb mediante PCR a partir del RNA de células CrFK infectadas. El marcador de tamaño molecular está señalado con la letra M.

Para determinar la presencia del inserto en las clonas resultantes de la transformación de *E. coli* DH5 α , se extrajo el DNA plasmídico de diez clonas elegidas al azar (Figura 16) para llevar a cabo una PCR punto final con los oligonucleótidos iniciadores FW F9_red y RV F9_red. Como se muestra en la Figura 17, en todas las clonas, excepto la número seis, se detectó la banda esperada de 2, 085 pb correspondiente al amplicón NS6/7. En la doble restricción realizada con las enzimas *Eco*RI y *Hind*III de las diez clonas del vector pCR 4-TOPO-NS6/7, se obtuvo una banda de 2, 085 pb, la cual era la esperada para NS6/7 en todas las clonas con excepción de la seis. Así mismo, se observó una banda de 3, 900 pb, cuyo tamaño es el esperado para el vector pCR 4-TOPO lineal (Figura 18).

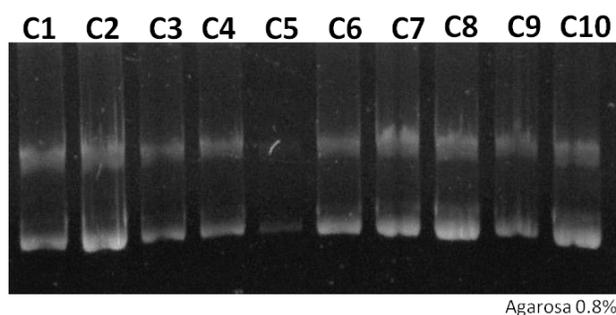


Figura 16. DNA plasmídico de diez clonas obtenidas de la transformación de bacterias competentes con el vector pCR 4-TOPO-NS6/7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) de diez clonas (C1-C10) elegidas al azar obtenidas de la transformación de *E. coli* DH5 α con la ligación del vector pCR 4-TOPO con el producto de PCR de la región codificante a NS6/7.

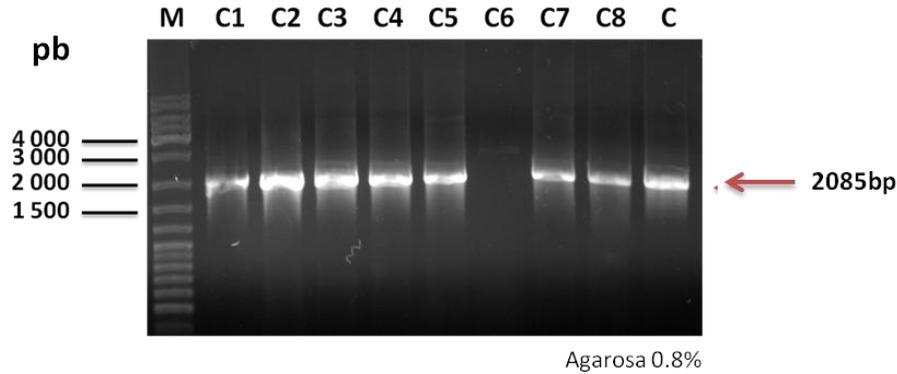


Figura 17. Amplificación por PCR del fragmento codificante a NS6/7 del plásmido pCR 4-TOPO-NS6/7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) que muestra la amplificación del fragmento codificante a NS6/7 de ocho clonas (indicadas con la letra C y el número de la clona) obtenidas en la transformación de *E. coli* DH5 α con la ligación del vector pCR 4-TOPO con el producto de PCR de la región codificante a NS6/7, con un producto de amplificación de 2, 085 pb. El marcador de tamaño molecular se encuentra señalado con la letra M y en el control positivo indicado con la letra C en el último carril, se observa una banda correspondiente a la amplificación del fragmento codificante a NS6/7 de células CrFK infectadas por FCV F9.

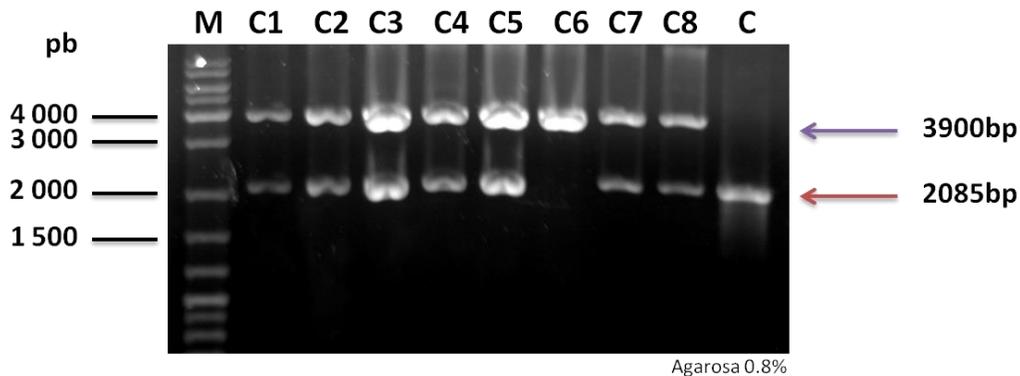


Figura 18. Doble restricción del plásmido pCR 4-TOPO-NS6/7. Se muestra la doble restricción de ocho clonas de las bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pCR 4-TOPO-NS6/7. Con la flecha roja se encuentra indicada la banda correspondiente al inserto NS6/7 con un tamaño de 2, 085 pb y, la flecha morada, indica la banda correspondiente al vector pCR 4-TOPO lineal, con un tamaño de 3, 900 pb. El marcador de tamaño molecular se encuentra señalado con la letra M y en el control positivo indicado con la letra C en el último carril, se observa una banda correspondiente a la amplificación por PCR del fragmento codificante a NS6/7 de células CrFK infectadas por FCV F9.

13.4.2 Subclonación en el vector de expresión pDsRed2-N1

El plásmido recombinante pJET1.2-NS6/7 obtenido de la clona 1, fue sometido a una doble restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para liberar el inserto correspondiente a NS6/7. Por otro lado, se realizó la doble restricción del vector pDsRed2-N1 con las mismas enzimas para efectuar la clonación dirigida, obteniendo un plásmido recombinante que fue nombrado pDsRed2-N1-NS6/7. Para determinar si el plásmido contenía el inserto esperado, se realizó la extracción de DNA plasmídico de las seis clonas obtenidas en el proceso de transformación con la ligación del vector pDsRed2-N1 con el fragmento codificante a NS6/7, con la finalidad de usarlo como molde para realizar los ensayos de PCR punto final (Figura 19). En la mayoría de las clonas (excepto la cinco), se obtuvo una banda del tamaño de 2,085 pb que corresponde a NS6/7 (Figura 20). Así mismo, todas las clonas fueron sometidas a una doble restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa, manera por la cual se observó una banda con un tamaño de 2, 085 pb correspondiente al inserto NS6/7, también se visualizó la banda específica del vector pDsRed2-N1 lineal, que posee un tamaño de 4, 700 pb (Figura 21).

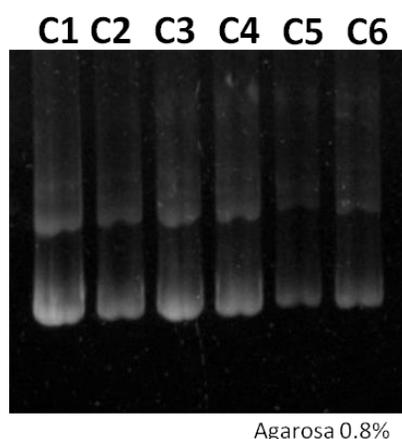


Figura 19. DNA plasmídico de las seis clonas obtenidas de la transformación de bacterias competentes con pDsRed2-N1-NS6/7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) de las seis clonas obtenidas de la transformación de *E. coli* DH5 α con la ligación del vector pDsRed2-N1 con NS6/7. Las clonas se encuentran indicadas con la letra C y el número correspondiente a la clona.

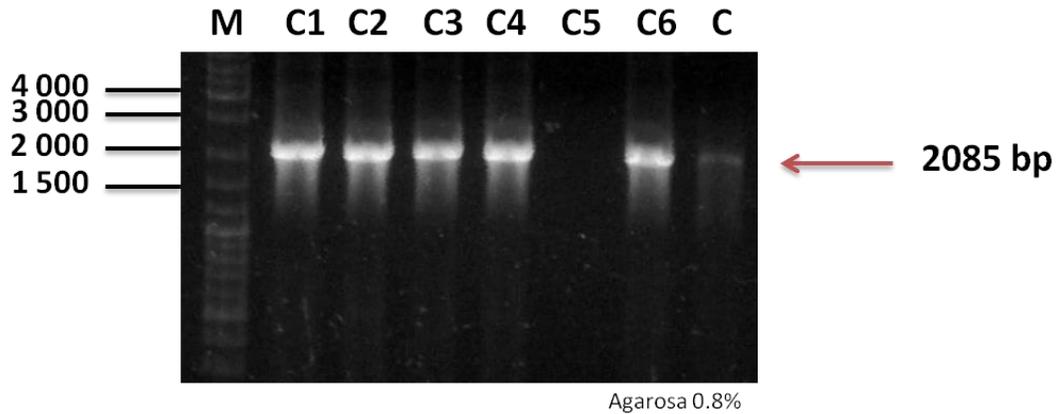


Figura 20. Amplificación por PCR del fragmento codificante a NS6/7 del plásmido pDsRed2-N1-NS6/7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) que muestra la amplificación del fragmento codificante a NS6/7 de las seis clonas (C1-6) obtenidas en la transformación de *E. coli* DH5 α con la ligación del vector pDsRed2-N1 con NS6/7. La flecha roja muestra el tamaño esperado de 2,085 pb del fragmento codificante a NS6/7. El marcador de tamaño molecular se encuentra señalado con la letra M y en el control positivo indicado con la letra C en el último carril, se observa una banda correspondiente a la amplificación del fragmento codificante a NS6/7 de células CrFK infectadas por FCV F9.

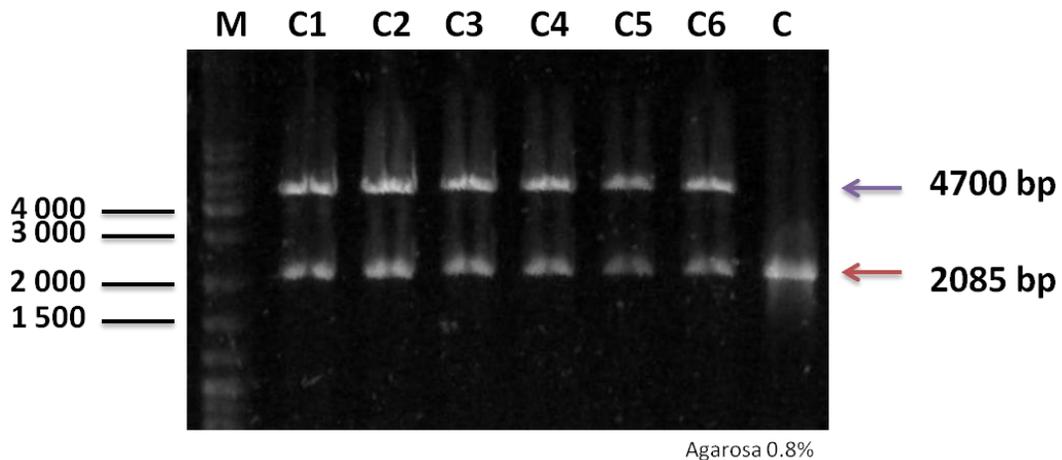


Figura 21. Doble restricción del plásmido pDsRed2-N1-NS6/7. Se muestra la doble restricción de las clonas 1-6 de las bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pDsRed2-N1-NS6/7. Con la flecha roja se encuentra indicada la banda correspondiente al inserto NS6/7 con un tamaño de 2,085 pb y, la flecha morada, indica la banda correspondiente al vector pDsRed2-N1 lineal, con un tamaño de 4,700 pb. El marcador de tamaño molecular se encuentra señalado con la letra M y en el control positivo indicado con la letra C en el último carril, se observa una banda correspondiente a la amplificación del fragmento codificante a NS6/7 de células CrFK infectadas por FCV F9.

13.4.3 Secuenciación del vector pDsRed2-N1-NS6/7

Para determinar si el inserto NS6/7 del vector pDsRed2-N1-NS6/7 no poseía mutaciones que comprometieran el estudio, las clonas 1, 2, 3 y 4 fueron enviadas a secuenciar a la Unidad de Secuenciación del Langebio, Cinvestav. Posteriormente, se realizó el análisis de las secuencias nucleotídicas de las cuatro clonas, en las cuales registraron mutaciones silenciosas en los nucleótidos 3417 en las clonas 1, 2 y 3, así como el nucleótido 4179 en la clona 4. En todas las clonas se determinaron las siguientes mutaciones: 3942, 4179, 4521, 4524 y 4833, por otro lado (Figura del apéndice A5), se identificó una mutación con cambio de sentido en el nucleótido 3777, el cual genera el cambio de una asparagina por una serina en el residuo 1314 (Figura del apéndice A6).

13.5 Transfección con lipofectamina del vector de expresión pDsRed2-N1-NS6/7 en células Hek 293T

Para expresar a la proteína NS6/7 y determinar su posible efecto en la inducción de la apoptosis, se realizaron ensayos de transfección de los vectores pDsRed2-N1 y pDsRed2-N1-NS6/7 en células HEK293T con diferentes cantidades de DNA plasmídico, las células fueron analizadas por microscopía de epifluorescencia a las 24 y 48 h después de la transfección.

En la Figura 22, se muestran las imágenes de las células transfectadas con el vector pDsRed2-N1 con un tiempo de incubación de 24 h postransfección, en el cual se observó en una muy baja proporción la fluorescencia de la proteína rojo fluorescente en las células transfectadas con 0.5 y 1 µl del vector de expresión. Sin embargo, a las 48h post-transfección, se observó en una mayor proporción la señal de la proteína rojo en las células transfectadas (Figura 23).

La transfección de las células con el plásmido recombinante pDsRed2-N1-NS6/7, fue realizada con las clonas 3 y 4. Las células observadas a las 24 h

postransfección, mostraron la señal de la proteína bandera rojo, con excepción de las tratadas con 0.5 μ l del plásmido recombinante (Figura 24).

A las 48 h postransfección, la mayoría de las células tratadas con las diferentes cantidades de plásmido recombinante pDsRed2-N1-NS6/7 mostraron la presencia de la proteína bandera rojo (Figura 25), indicando que la transfección se había llevado a cabo de manera eficiente.

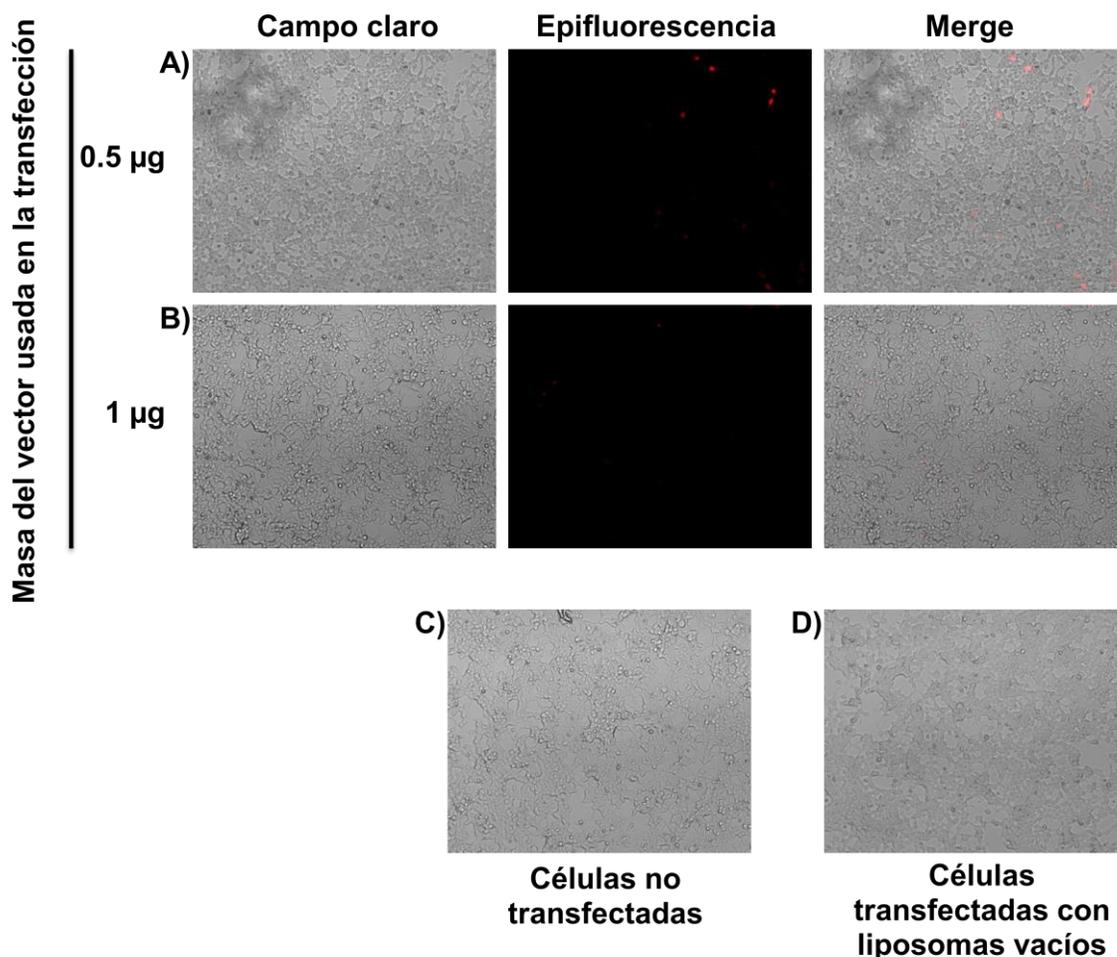


Figura 22. Células HEK293T 24 h postransfección con el vector pDsRed2-N1 por medio de liposomas. Las células HEK293T, fueron transfectadas con el vector de expresión eucariótico pDsRed2-N1, el cual posee una proteína bandera fluorescente color rojo, por 24h. En la fila A), se muestran las células transfectadas con 0.5 μg del vector pDsRed2-N1. La fila B) corresponde a las células transfectadas con 1 μg del vector pDsRed2-N1. En C) se muestran las células que no fueron sometidas a transfección, en la fila D), se encuentran las células transfectadas con liposomas vacíos.

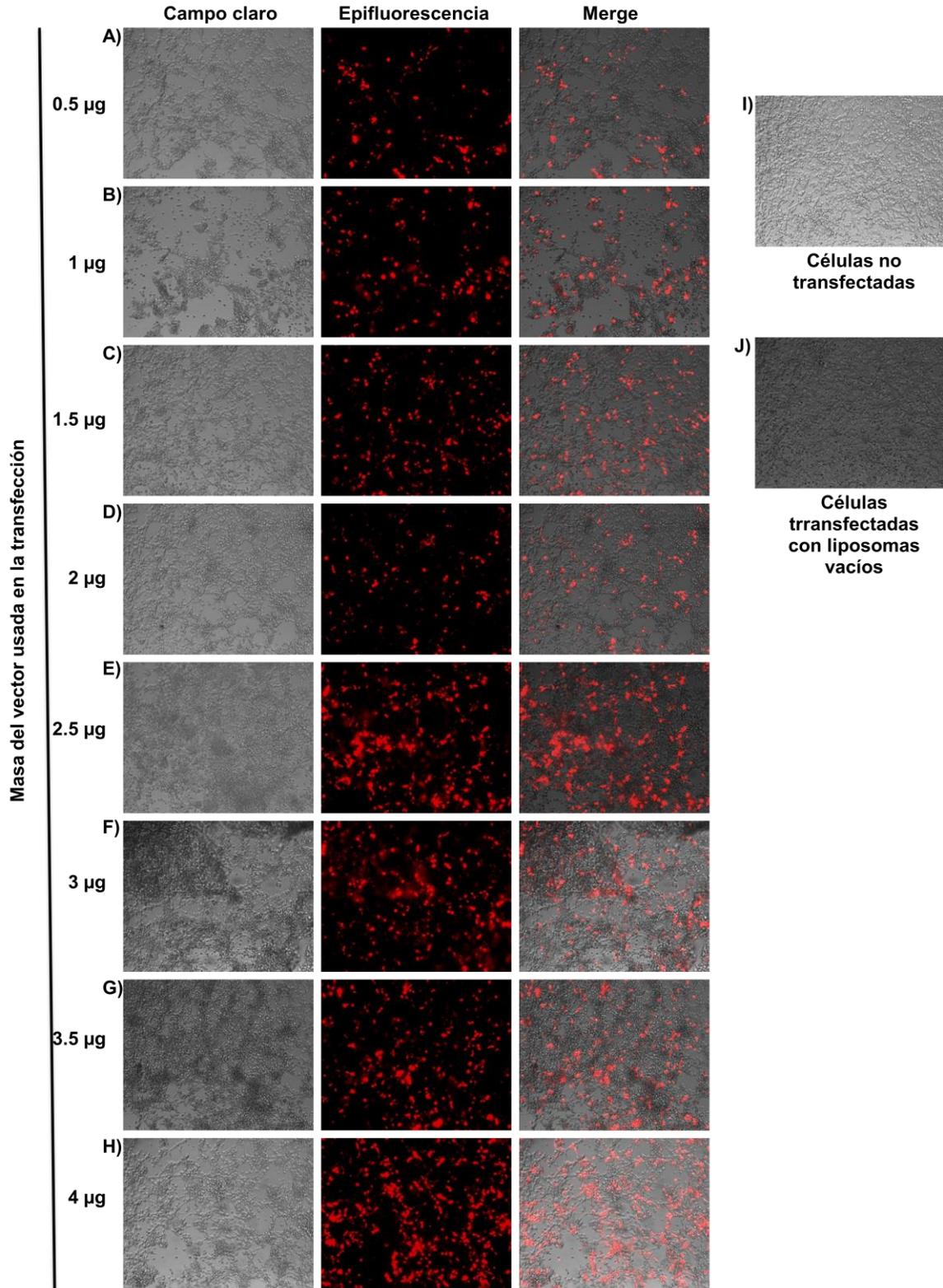


Figura 23. Células HEK293T 48 h postransfección con el vector pDsRed2-N1 por medio de liposomas. Las células HEK293T, fueron transfectadas con el vector de expresión eucariótico pDsRed2-N1, el cual posee una proteína bandera fluorescente color rojo por 48 h. La transfección se llevó a cabo con diferentes masas del vector pDsRed2-N1, las imágenes de las células transfectadas, se encuentran ordenadas de manera ascendente en función de la cantidad del vector usado. De A a E se muestran transfecciones de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4 μg de vector. En I) se muestran las células que no fueron sometidas a transfección, en la fila J), se encuentran las células transfectadas con liposomas vacíos.

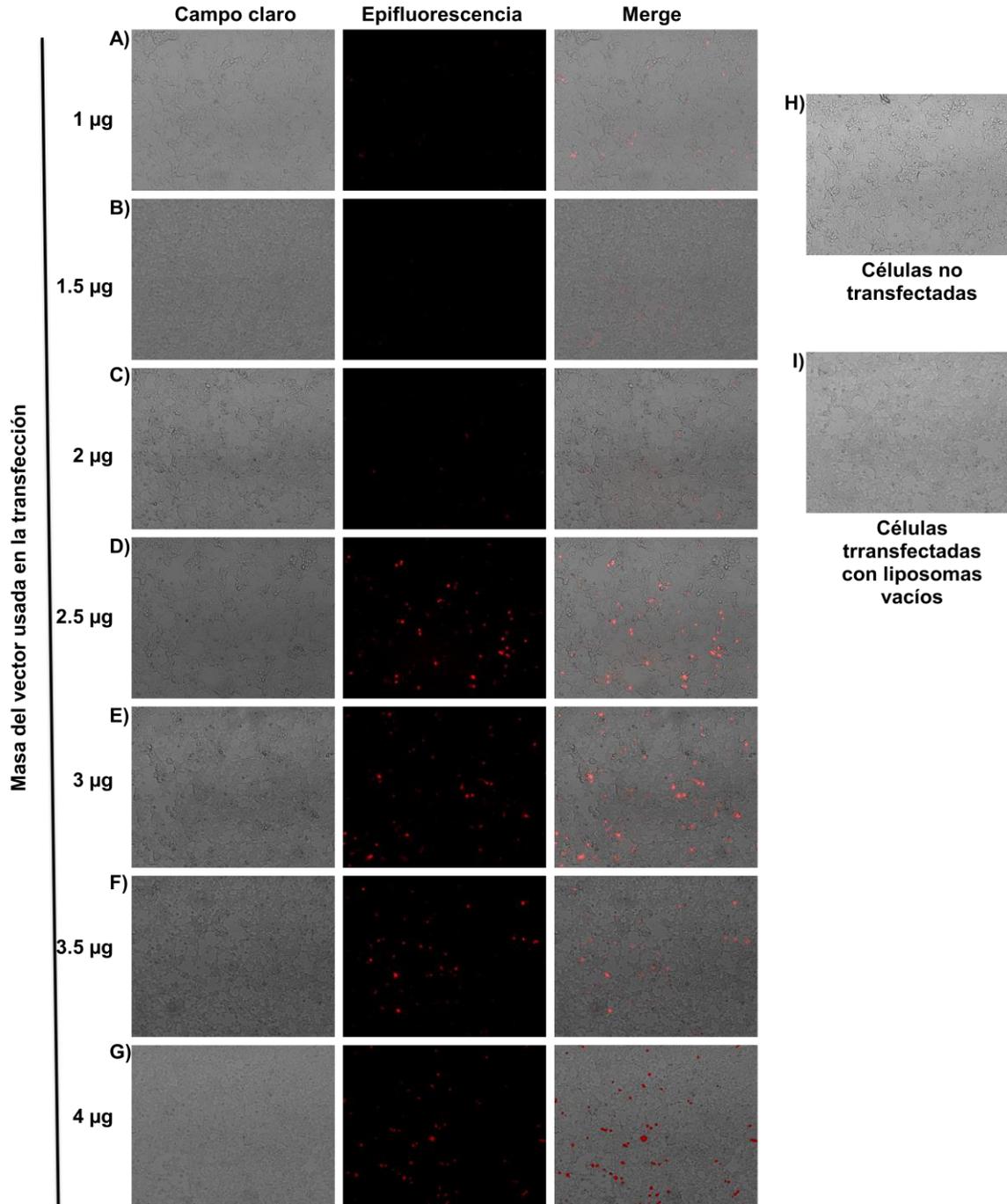


Figura 24. Células HEK293T 24 h postransfección con el vector pDsRed2-N1-NS6/7 por medio de liposomas. Las células HEK293T fueron transfectadas con el vector de expresión eucariótico pDsRed2-N1-NS6/7, el cual posee una proteína bandera fluorescente color rojo fusionada con el fragmento codificante a NS6/7. De A a G se muestran transfecciones de 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4 μ g de vector, respectivamente. En H) se muestran las células que no fueron sometidas a transfección y, en la fila I), se encuentran las células transfectadas con liposomas vacíos.

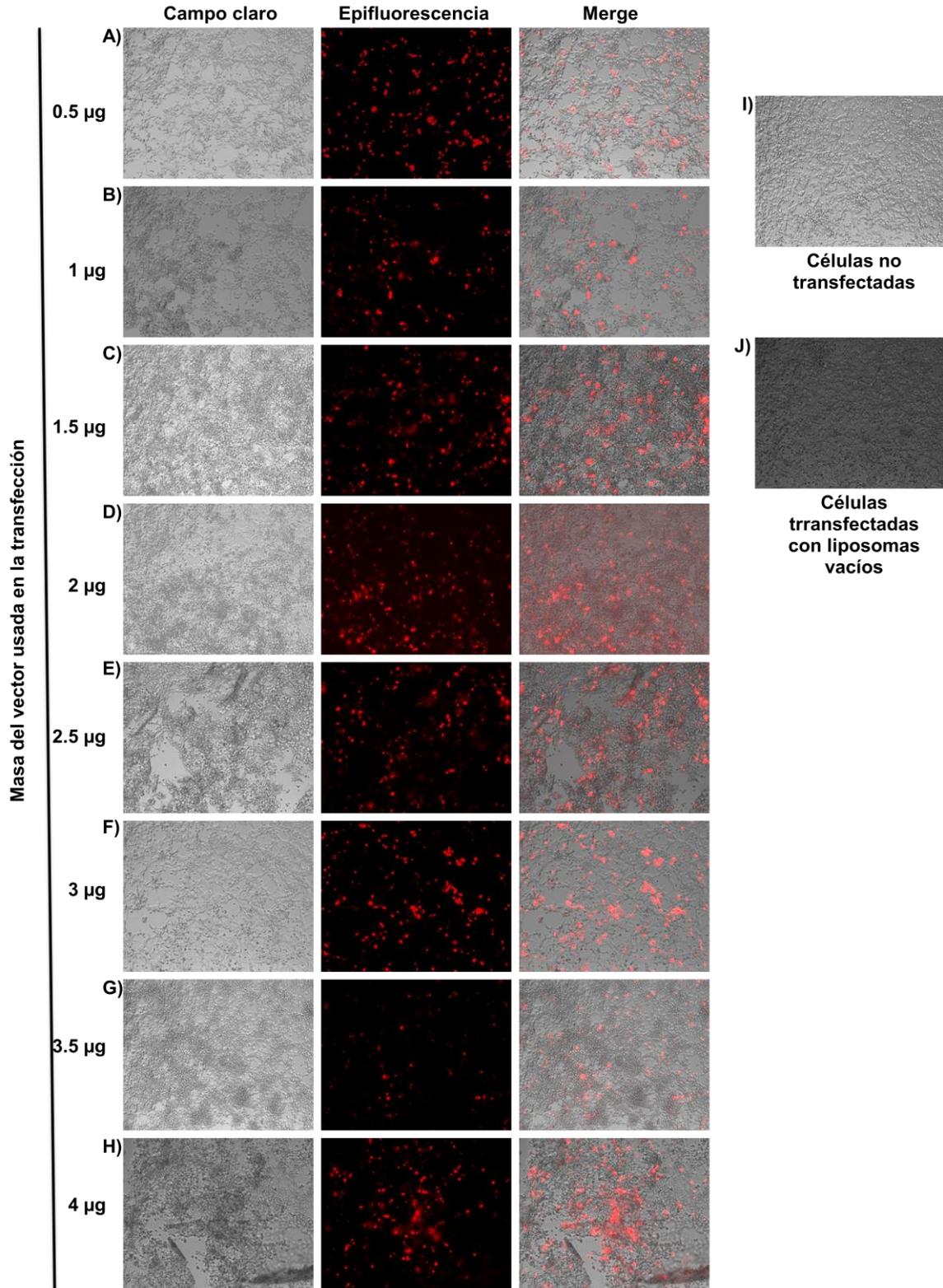


Figura 25. Células HEK293T 48 h postransfección con el vector pDsRed2-N1-NS6/7 por medio de liposomas. Las células HEK293T, fueron transfectadas con el vector de expresión eucariótico pDsRed2-N1-NS6/7, el cual posee una proteína bandera fluorescente color rojo fusionada con el fragmento codificante a NS6/7, la cual se observa en las imágenes de la columna correspondiente a la microscopía de epifluorescencia y a la columna de la mezcla del campo claro y de epifluorescencia. La transfección se llevó a cabo con diferentes masas del vector pDsRed2-N1-NS6/7, las imágenes de las células transfectadas, se encuentran ordenadas en orden ascendente en función de la cantidad del vector usado. De A a H, se muestran transfecciones de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4 µg de vector. En J), se muestran las células que no fueron sometidas a transfección, en la fila K), se encuentran las células transfectadas con liposomas vacíos.

13.6 Expresión del mRNA correspondiente a la proteína NS6/7 fusionada con la proteína bandera con fluorescencia color rojo

Para determinar si la expresión del mRNA de la proteína NS6/7 recombinante inducía efecto citopático en las células HEK293T transfectadas con el vector pDsRed2-N1-NS6/7, se compararon las imágenes de campo claro entre las células transfectadas a las 24 y 48 h de incubación (Figuras 24 y 25), encontrando que hay un aumento en el desprendimiento de la monocapa y acumulación de células conforme aumenta la masa del DNA plasmídico usado para las transfecciones.

Adicionalmente, se realizó un análisis por western blot, para detectar la presencia de la proteína NS6/7 recombinante en los extractos de proteínas de las células transfectadas con el vector pDsRed2-N1-NS6/7, sin embargo, no se detectó la presencia de esta proteína (datos no mostrados).

14. DISCUSIÓN

El trabajo realizado en este proyecto, se centró en el interés de estudiar los factores virales responsables de la inducción de la apoptosis durante la infección por FCV; particularmente las proteínas NS. Para ello, inicialmente determinamos, mediante ensayos *in silico*, la estructura 3D de cada una de las proteínas NS (NS1-NS6/7), para relacionarlas por homología estructural con posibles dominios o fragmentos de proteínas implicadas en la apoptosis o en procesos celulares relacionados con el secuestro de los mecanismos celulares de traducción y replicación. Para determinar la predicción de la estructura 3D de las proteínas NS, la secuencia primaria de cada una de éstas fue obtenida en la base de datos del GenBank y fueron analizadas en la plataforma en línea I-TASSER, la cual calculó las estructuras 3D de estas proteínas, que fueron validadas con los algoritmos de QMEAN6 y gráficos de Ramachandran. Así mismo, la homología estructural fue determinada con el algoritmo COACH.

Para cada proteína NS, se obtuvieron cinco modelos calculados por I-TASSER, que fueron validados mediante los valores QMEAN y gráficos de Ramachandran, Para la proteína NS1 se eligió al modelo 1, mediante el cual fueron determinadas las proteínas con dominios estructuralmente cercanos a NS1 predichos por I-TASSER. Una proteína estructuralmente homóloga a NS1 predicha, es la Hsc20, la cual es una co-chaperona tipo J de *E. coli* que actúa cuando esta bacteria es sometida a estrés. (Vickery *et al.*, 2000). Existe una gran lista de chaperonas de RNA codificadas por virus de RNA que participan en el plegamiento correcto del RNA viral necesario para el proceso de infección. Por ejemplo, algunos virus que codifican este tipo de chaperonas, son los rotavirus, cuya proteína no estructural NSP2, funge como una chaperona de RNA putativa. Así mismo, en los poliovirus se ha encontrado que la proteína 3AB posee propiedades asociadas con el plegamiento del RNA viral y en los flavivirus, que codifican a una proteína llamada 2C, se ha determinado que está también posee actividad de chaperona (Jeffrey *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2015). Los moldes computados por COACH para la proteína NS1, fueron el represor transcripcional CopG de *Streptococcus spp* con unión al

DNA, así como los dominios hélice-bucle-hélice del complejo CLOCK-BMAL1 de humano con unión a DNA, dicho complejo es un factor de traducción y un regulador de los genes del criptocromo y los genes *Period*, implicados en el ciclo circadiano (Wang *et al.*, 2013). Esto indica que, probablemente, la proteína NS1 posee dominios de unión a ácidos nucleicos y que está implicada en procesos de transcripción o traducción.

Con respecto a la proteína NS2, se eligió al modelo 2, mediante el cual fueron determinadas las proteínas con dominios o fragmentos estructuralmente cercanos predichos por I-TASSER. Dos de éstas predicciones, fueron la glicoproteína-P de las especies *Caenorhabditis elegans* y *Mus musculus*, la cual es un transportador multi-fármaco con unión a ATP, que confiere la resistencia a fármacos en el tratamiento contra el cáncer, ya que expulsa sustancias de la célula hacia el espacio extracelular (Jin *et al.*, 2012). Debido a que la proteína NS2 posee aminoácidos con alta energía, el análisis *in silico* no fue preciso. Sin embargo, se sabe que la proteína NS2 de FCV, es una proteína transmembranal con localización en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi que, junto con las proteínas NS3 y NS4, inician la formación de los complejos de replicación (Bailey *et al.*, 2005). No se ha encontrado una función que sugiera que la NS2 sea una proteína de transporte, no obstante, podría fungir como una proteína de mimetismo celular implicada en el transporte de moléculas fuera o dentro de la célula. Las proteínas molde determinadas por COACH para la predicción del ligando poseen un C-score de 0.03, lo cual indica poca confiabilidad y no se incluyeron en este estudio.

El modelo elegido para la proteína NS3 fue el modelo 1, mediante el cual se predijeron péptidos o secciones de proteínas cercanas estructuralmente a NS3, que fueron la proteína P97/vcp, la cual es una ATPasa asociada con varias funciones celulares como la degradación asociada al retículo endoplásmico y a la fusión homotípica de membranas (Davies *et al.*, 2008). Así como una ATPasa que contiene valosina de *Thermoplasma acidophilum*. Una de las proteínas molde para

la predicción del ligando, fue la proteasa integral de membrana dependiente de ATP de *Thermotoga marítima*, FtsH, la cual está involucrada en la degradación de proteínas de membrana dañadas o no necesarias para las bacterias. Se ha determinado *in vitro*, que la proteína NS3 de calicivirus, se encuentra asociada a membranas intracelulares como la del retículo endoplásmico y, junto con otras proteínas virales NS, para formar los complejos de replicación. Además, NS3 posee secuencias conservadas que corresponden a dominios de unión a NTP, los cuales están asociados con la actividad NTPasa (Gorbalenya *et al.*, 1990; Neil, 1990; Clarke y Lambden, 1997).

Para la proteína NS4 se eligió el modelo 2. Los moldes estructuralmente cercanos a ésta, fueron la lactonasa “quorum-quenching” de *Agrobacterium tumefaciens* (código PDB: 2r2dA) y la beta-glucosidasa de *Clostridium cellulovorans* (código PDB: 3ai0A). El modelo de predicción de ligando con el C-score más alto fue la N-Acil Homoserina Lactona Hidrolasa de *Bacillus thuringiensis* (código PDB: 3dhcA), que hidroliza la N-acil-l-homoserina lactona. Esto podría sugerir que la proteína NS4 posee una función enzimática. Sin embargo, el nivel de confianza de las predicciones de esta proteína no son altos, por ende, los datos no pueden ser concluyentes para NS4.

El modelo 2 fue elegido para la proteína NS5. Las proteínas con segmentos cercanos estructuralmente a ésta, fueron: la RNA polimerasa dirigida por DNA del fago T7 y la proteína TDP-43 de unión a DNA/RNA de humano que posee múltiples funciones en la represión transcripcional, “splicing” del pre-mRNA y regulación traduccional, se ha encontrado que ésta reprime la traducción del VIH-I. La proteína NS5 o VPg funciona como un “cap” proteinaceo para permitir el reclutamiento de los factores de iniciación eucariótica y de ésta manera, iniciar la síntesis de las proteínas virales, por ende, es de esperarse que posea homología con proteínas asociadas con el control de la traducción y transcripción. Los modelos de predicción del ligando predichos por COACH tuvieron un C-score bajo, por lo tanto no se consideraron en este estudio.

Para la proteasa-polimerasa viral NS6/7, se eligió al modelo 1. Los segmentos cercanos estructuralmente a la proteína NS6/7 fueron el precursor de la proteína 3CD de poliovirus y la polimerasa de RNA dependiente de RNA del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo. Los modelos de predicción del ligando fueron la polimerasa B3 del Coxsackievirus y la polimerasa de poliovirus, ambas con unión a ácidos nucleicos. La proteasa polimerasa NS6/7, es una de las más estudiadas de los calicivirus, cuya función principal es escindir la poliproteína para liberar a las proteínas NS. Se ha determinado que posee homología con la proteína 3CD de poliovirus, como se observó en este análisis *in silico*. Así mismo, se observó que la polimerasa de FCV posee homología estructural con la NS7 del virus RHD, el cual es un calicivirus. Los datos obtenidos por el análisis *in silico* para la proteasa-polimerasa NS6/7 se encuentran en función de los estudios ya reportados para este complejo proteico.

A pesar de que no se encontraron proteínas estructuralmente homólogas a las NS de FCV cuya función se encuentre directamente asociada con la apoptosis, sabemos que la NS6/7 es un complejo asociado con la replicación y traducción viral, así como la escisión de proteínas celulares. A este respecto, un estudio realizado en el 2016 por Kaiser *et al.*, el cual consistió en clonar al complejo NS6/7 en un sistema de expresión en levaduras inducido por fármacos, se encontró que la expresión de dicho complejo fue tóxica después de la inducción, probablemente por la actividad proteolítica de la polimerasa viral, la cual degradó a las proteínas eIF4G y PABP. En los poliovirus, los cuales son cercanos filogenéticamente a los calicivirus, existe un proceso de inducción de la apoptosis desencadenado por la expresión de la proteasa 2A, la cual se encarga de escindir los factores del inicio de la traducción eIF4GI y eIF4GII, ocasionando la inhibición de la síntesis de proteínas celulares. Se ha sugerido que la proteasa 2A induce apoptosis por medio del arresto de la traducción dependiente de cap de algunos mRNAs celulares que codifican proteínas necesarias para mantener la viabilidad celular, así como el control de la traducción de mRNAs involucrados con la inducción de la

apoptosis (Goldstaub *et al.*, 2000). En el análisis *in silico*, se encontró que la NS1 tiene homología estructural con un factor de traducción y un represor transcripcional, lo cual podría indicar que esta proteína podría participar en la traducción de proteínas pro-apoptóticas, así como en la represión de la transcripción de mRNAs asociados con la sobrevivencia celular.

El procedimiento de la inducción de la apoptosis por las proteínas NS, se basó en la clonación de los fragmentos codificantes a NS1-5 y al complejo de las proteínas NS6/7 en vectores de expresión eucariótica para su transfección en células eucariotas. Para ello, se extrajo el RNA de células CrFK infectadas por FCV F9, a partir del cual se realizó una RT-PCR con los oligonucleótidos específicos para amplificar los fragmentos codificantes a NS1-5 y NS6/7, ambos fragmentos fueron clonados en vectores de tránsito y, posteriormente, subclonados en vectores de expresión eucariótica para realizar el proceso de transfección y determinar si existe una inducción de la apoptosis por el fragmento de la poliproteína NS1-5 y la proteasa-polimerasa NS6/7.

La clonación en los vectores de tránsito del fragmento que codifica a NS1-5, se llevó a cabo de manera exitosa. Sin embargo, la subclonación de dicho fragmento en el vector de expresión, no fue exitosa con el primer protocolo utilizado, por ende, se realizaron varias estrategias para ligar el vector de expresión con el fragmento codificante a NS1-5, una de éstas, fue escindir al vector de tránsito y al vector de expresión con enzimas isoesquiméricas, así como realizar la transformación en bacterias *E. coli* ultracompetentes XL10-Gold con diferentes proporciones molares vector-inserto, no obstante, no se obtuvo el plásmido recombinante. Una de las razones por las cuales no se pudo subclonar el inserto NS1-5 en el vector de expresión, es porque probablemente la secuencia codificante a NS1-5, es altamente inestable, además, se ha determinado que existen dificultades en la clonación de insertos que codifican proteínas que interfieren con las funciones celulares normales, inhibiendo el crecimiento celular, dando como resultado la muerte de las bacterias transformadas (Kimelman *et al.*,

2012), el ORF1 codifica proteínas que están involucradas con el secuestro de la maquinaria celular de traducción, así como de estructuras celulares, lo cual explicaría la dificultad de clonar NS1-5 en el vector de expresión.

La clonación en el vector de tránsito de la región codificante a NS6/7, fue lograda con éxito, así como la subclonación de este inserto en el vector de expresión pDsRed2-N1, generando un plásmido recombinante que fue llamado pDsRed2-N1-NS6/7 que, al ser traducido, produce a la proteína NS6/7 fusionada en su extremo C-terminal a la proteína reportera con fluorescencia roja. La presencia del inserto NS6/7 en el vector de expresión, fue confirmada mediante PCR punto final y doble restricción del DNA plasmídico de las bacterias transformadas. Además, mediante la secuenciación del inserto, se determinó que existen mutaciones silenciosas en los nucleótidos 204, 564, 1308, 1311 y 1620. Aunado a que se identificó una mutación con cambio de sentido en el nucleótido 729, la cual genera el cambio de una asparagina por una serina en el residuo 243, ambos son aminoácidos pequeños, polares y sin carga. Cabe destacar que la sustitución N243S no se encuentra dentro del sitio catalítico de la proteasa viral en estudio, por lo tanto el plásmido pDsRed2-N1-NS6/7 fue usado para realizar la transfección.

La transfección del plásmido pDsRed2-N1-NS6/7 fue realizada en células HEK293T, ya que esta línea celular contiene el antígeno T de SV40 que permite la replicación episomal de los plásmidos transfectados que contienen el origen de replicación SV40, lo cual genera un aumento en la expresión de los vectores y, en consecuencia, un incremento en la producción de proteína recombinante (Graham *et al.*, 1977). Las cantidades del DNA plasmídico de los vectores pDsRed2-N1 y pDsRed2-N1-NS6/ que fueron usadas en la transfección, fueron de 0.5µg a 4µg y las células fueron analizadas por microscopía de fluorescencia a las 24 y 48h postransfección.

Las células transfectadas con el vector pDsRed2-N1 después de 24h postransfección, mostraron poca señal de fluorescencia roja de la proteína reportera en las diferentes cantidades de DNA plasmídico ensayadas. Sin embargo, la eficiencia de la transfección aumentó cuando se analizó a las 48 h, condición en la que se pudo observar una mayor presencia en la producción de la proteína reportera en las células tratadas con 2.5, 3, 3.5 y 4 μ g de DNA plasmídico. Un fenómeno interesante es que, conforme aumentó la cantidad de DNA plasmídico, se observó un incremento en el desprendimiento de la monocapa y se registró la formación de cúmulos celulares, razón por la cual las células no pudieron ser cuantificadas (Figura del apéndice A7). Estos acontecimientos, pueden deberse a que en el laboratorio se ha observado que la lipofectamina genera daño en las membranas celulares o a que el plásmido no se encontrase altamente puro.

Las transfecciones con el vector pDsRed2-N1-NS6/7 en las células HEK293T observadas a las 24 h postransfección, mostraron señal de la proteína reportera en las células transfectadas con 1 μ g de plásmido, obteniendo un incremento en la producción de la proteína en las células tratadas con 2.5, 3, 3.5 y 4 μ g de DNA plasmídico. A las 48 h postransfección, se observó un aumento en la producción de la proteína, ya que en todos los tratamientos con las diferentes cantidades de DNA plasmídico, se detectó señal de fluorescencia roja de la proteína reportera. Las células tratadas con 2 μ hasta los 4 μ g de DNA plasmídico fueron las que presentaron mayor eficiencia de transfección, sin embargo, éstas también se desprendieron de la monocapa y formaron cúmulos celulares. Debido a que la formación de cúmulos celulares y desprendimiento de la monocapa, también fueron observados en las células transfectadas con el vector pDsRed2-N1 a las 48h postransfección, este evento no puede adjudicarse a un efecto de la expresión de la proteína NS6/7 (Figura del apéndice A7). Sin embargo, aunque cualitativamente no observamos un efecto citopático relacionado a la transfección de la proteína NS6/7, era importante determinar su expresión de forma cuantitativa, por ende, realizamos ensayos de western blot con anticuerpos

policlonales dirigidos contra la polimerasa NS7 generados en nuestro laboratorio. .A pesar de ello, bajo ninguna de las condiciones ensayadas logramos la detección de esta proteína.

La expresión de proteasas tanto en sistemas procariotas como eucariotas, es una tarea difícil, debido a que el efecto de su actividad proteolítica en ambos sistemas es dañino. Dado a que: 1) los dos plásmidos de expresión de la NS6/7 provenientes de dos clonaciones distintas fueron secuenciados y no se encontró ninguna mutación o cambio del marco de lectura para su expresión, y 2) a que se observó la fluorescencia de la proteína NS6/7 fusionada a la proteína fluorescente color rojo durante los ensayos de transfección, es posible que su detección con los anticuerpos utilizados no sea eficiente, ya que se han presentado algunas dificultades para ello en otras condiciones experimentales en el laboratorio.

15. RESUMEN DE RESULTADOS

- 1) Se realizaron las predicciones *in silico* de los modelos 3D de las proteínas NS de FCV.
- 2) El fragmento que codifica a la proteasa-polimerasa NS6/7, fue clonado en el vector de expresión eucariótica pDsRed2-N1, con la proteína bandera rojo “cherry” fusionada al extremo C-terminal de la NS6/7.
- 3) No se detectó la proteína NS6/7 recombinante mediante western blot en extractos de proteínas de células transfectadas con la construcción pDsRed2-N1-NS6/7.

16. PERSPECTIVAS

- 1) Realizar el refinamiento de los modelos 3D de las estructuras predichas para las proteínas NS.
- 2) Clonar la secuencia codificante a NS1-5 en vectores de expresión inducidos por fármacos.
- 3) Utilizar otros anticuerpos contra la proteína NS6/7 recombinante para detectar su expresión.
- 4) Determinar si el desprendimiento de la monocapa transfectada con los vectores pDsRed2-N1 y pDsRed2-N1-NS6/7 es una consecuencia de la muerte celular.

19. APÉNDICE

			20		40		60
NS1-5 M86379	ATGTCTCAA	CTCTGAGCT	CGTGCTTAA	ACTCACAGT	TCCGAAAGG	CTTTGTGCAC	60
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	ATGTCTCAA	CTCTGAGCT	CGTGCTTAA	ACTCACAGT	TCCGAAAGG	CTTTGTGCAC	60
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	ATGTCTCAA	CTCTGAGCT	CGTGCTTAA	ACTCACAGT	TCCGAAAGG	CTTTGTGCAC	60
			80		100		120
NS1-5 M86379	TCTGTCAA	TAACACTTG	ACGGAGGCG	GATCTTCAG	ATATTTATA	CAAGCTCTCA	120
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	TCTGTCAA	TAACACTTG	ACGGAGGCG	GATCTTCAG	ATATTTATA	CAAGCTCTCA	120
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	TCTGTCAA	TAACACTTG	ACGGAGGCG	GATCTTCAG	ATATTTATA	CAAGCTCTCA	120
			140		160		180
NS1-5 M86379	CGCACTATA	GTGCTGAGG	TTGCCCTTCT	TGTGCTAGT	ACGACGTAT	TCCTAACTGC	180
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	CGCACTATA	GTGCTGAGG	TTGCCCTTCT	TGTGCTAGT	ACGACGTAT	TCCTAACTGC	180
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	CGCACTATA	GTGCTGAGG	TTGCCCTTCT	TGTGCTAGT	ACGACGTAT	TCCTAACTGC	180
			200		220		240
NS1-5 M86379	ACCTCTGGT	ACGTCCCGA	TGACGGGTCT	TCGACAATG	CGATTCCAT	ATGGGAGGAT	240
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	ACCTCTGGT	ACGTCCCGA	TGACGGGTCT	TCGACAATG	CGATTCCAT	ATGGGAGGAT	240
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	ACCTCTGGT	ACGTCCCGA	TGACGGGTCT	TCGACAATG	CGATTCCAT	ATGGGAGGAT	240
			260		280		300
NS1-5 M86379	GTCACAAAG	CTTCAACCT	CTCTCTCTG	CTCTCTGAG	ACACCTCCG	CGAGTTATGC	300
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	GTCACAAAG	CTTCAACCT	CTCTCTCTG	CTCTCTGAG	ACACCTCCG	CGAGTTATGC	300
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	GTCACAAAG	CTTCAACCT	CTCTCTCTG	CTCTCTGAG	ACACCTCCG	CGAGTTATGC	300
			320		340		360
NS1-5 M86379	CCTGAGGACT	TGGTTAATG	GGCTGCTCAT	ATCCGTAAG	CGCTATCCAC	TCAGTCCCAC	360
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	CCTGAGGACT	TGGTTAATG	GGCTGCTCAT	ATCCGTAAG	CGCTATCCAC	TCAGTCCCAC	360
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	CCTGAGGACT	TGGTTAATG	GGCTGCTCAT	ATCCGTAAG	CGCTATCCAC	TCAGTCCCAC	360
			380		400		420
NS1-5 M86379	CCGGCTAAT	CTGAAATGT	CAAAGAACAG	CTCACTTTCT	TATTAGTCAT	GGCTGAGGCG	420
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	CCGGCTAAT	CTGAAATGT	CAAAGAACAG	CTCACTTTCT	TATTAGTCAT	GGCTGAGGCG	420
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	CCGGCTAAT	CTGAAATGT	CAAAGAACAG	CTCACTTTCT	TATTAGTCAT	GGCTGAGGCG	420
			440		460		480
NS1-5 M86379	ATGCTGCC	AACGATCCG	AGCGTCAAT	CCACTGCAC	AACAACAC	GGCTGCACGG	480
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	ATGCTGCC	AACGATCCG	AGCGTCAAT	CCACTGCAC	AACAACAC	GGCTGCACGG	480
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	ATGCTGCC	AACGATCCG	AGCGTCAAT	CCACTGCAC	AACAACAC	GGCTGCACGG	480
			500		520		540
NS1-5 M86379	TTGGAATG	GGGAGAAAT	CTTCTCTAA	CCTCTTGAC	TTCTCCTTG	AAGAGTTGGT	540
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	TTGGAATG	GGGAGAAAT	CTTCTCTAA	CCTCTTGAC	TTCTCCTTG	AAGAGTTGGT	540
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	TTGGAATG	GGGAGAAAT	CTTCTCTAA	CCTCTTGAC	TTCTCCTTG	AAGAGTTGGT	540
			560		580		600
NS1-5 M86379	GTGTCAAA	ATATTTCCA	AACTACTGC	ATTTGGAAA	TTATCTTGA	AAAAGCATGC	600
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	GTGTCAAA	ATATTTCCA	AACTACTGC	ATTTGGAAA	TTATCTTGA	AAAAGCATGC	600
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	GTGTCAAA	ATATTTCCA	AACTACTGC	ATTTGGAAA	TTATCTTGA	AAAAGCATGC	600
			620		640		660
NS1-5 M86379	TATTGTAAT	CCTATGGAG	GCAGTGGTT	ACTGCTGCC	AACAAAAGT	AAGGGAAATG	660
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	TATTGTAAT	CCTATGGAG	GCAGTGGTT	ACTGCTGCC	AGCAAAAGT	AAGGGAAATG	660
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	TATTGTAAT	CCTATGGAG	GCAGTGGTT	ACTGCTGCC	AGCAAAAGT	AAGGGAAATG	660
			680		700		720
NS1-5 M86379	AAAAACTTT	AGAGTGATC	GCTAAAACCT	CTTATTGGT	GATTTATAG	TGGTCTACGG	720
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	AAAAACTTT	AGAGTGATC	GCTAAAACCT	CTTATTGGT	GATTTATAG	TGGTCTACGG	720
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	AAAAACTTT	AGAGTGATC	GCTAAAACCT	CTTATTGGT	GATTTATAG	TGGTCTACGG	720
			740		760		780
NS1-5 M86379	TTCTTGACC	TGGACAACCC	AAACCCGAT	GGTTTCCTC	CAAAACTCA	AGGGCTTGTA	780
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	TTCTTGACC	TGGACAACCC	AAACCCGAT	GGTTTCCTC	CAAAACTCA	AGGGCTTGTA	780
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	TTCTTGACC	TGGACAACCC	AAACCCGAT	GGTTTCCTC	CAAAACTCA	AGGGCTTGTA	780
			800		820		840
NS1-5 M86379	AAACCCCTG	ATTTGGCGA	GATTATTGAT	AATCATGAA	ACACAATAT	TGGCTGGATC	840
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	AAACCCCTG	ATTTGGCGA	GATTATTGAT	AATCATGAA	ACACAATAT	TGGCTGGATC	840
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	AAACCCCTG	ATTTGGCGA	GATTATTGAT	AATCATGAA	ACACAATAT	TGGCTGGATC	840
			840				
NS1-5 M86379	ATCACA						846
Clona 1_pJET1.2-NS1-5	ATCACA						846
Clona 4_pJET1.2-NS1-5	ATCACA						846

Figura A1. Secuencias nucleotídicas parciales del fragmento codificante a NS1-5 de la región 5'. Al lado izquierdo de las secuencias nucleotídicas, se especifica la primer secuencia corresponde a la obtenida en el Genbank, con el número de acceso M86379, las siguientes secuencias son las clonas 1 y 4. A la derecha, especifica el número total de nucleótidos de las secuencias obtenidas. Se indica el número de nucleótido en la barra vertical superior en el alineamiento.

	3,280		3,300		3,320			
NS1-5 M86379		GTCAATGACA	GTGTTAGGTT	GGATGAACTA	CCCGCCAATC	AGCATGTGGT	AACCGTTAAT	60
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		GTCAATGACA	GTGTTAGGTT	GGATGAACTA	CCCGCCAATC	AGCATGTGGT	AACCGTTAAT	60
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		GTCAATGACA	GTGTTAGGTT	GGATGAACTA	CCCGCCAATC	AGCATGTGGT	AACCGTTAAT	60
	3,340		3,360		3,380			
NS1-5 M86379		TCCGGTGTTCG	ATTTGGCCTG	GGCTGTTTCGT	CGTCATCTCA	CACTGGCAGG	GCAGTTTCAA	120
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		TCCGGTGTTCG	ATTTGGCCTG	GGCTGTTTCGT	CGTCATCTCA	CACTGGCAGG	GCAGTTTCAA	120
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		TCCGGTGTTCG	ATTTGGCCTG	GGCTGTTTCGT	CGTCATCTCA	CACTGGCAGG	GCAGTTTCAA	120
	3,400		3,420		3,440			
NS1-5 M86379		GCTATCAGAG	CCGCATATGA	TGTGCTTACT	GTCCCCGACA	AGATCCCTGC	AATGTTGCGT	180
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		GCTATCAGAG	CCGCATATGA	TGTGCTTACT	GTCCCCGACA	AGATCCCTGC	AATGTTGCGT	180
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		GCTATCAGAG	CCGCATATGA	TGTGCTTACT	GTCCCCGACA	AGATCCCTGC	AATGTTGCGT	180
	3,460		3,480		3,500			
NS1-5 M86379		CACTGGATGG	ATGAGACCTC	CTTTTCTGAT	GACCACGTTG	TAACACAATT	TGTAACACCT	240
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		CACTGGATGG	ATGAGACCTC	CTTTTCTGAT	GACCACGTTG	TAACACAATT	TGTAACACCT	240
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		CACTGGATGG	ATGAGACCTC	CTTTTCTGAT	GACCACGTTG	TAACACAATT	TGTAACACCT	240
	3,520		3,540		3,560			
NS1-5 M86379		GGTGGCATAG	TCATCCTGGA	GTCTTGCGGT	GGTGCACGCA	TCTGGGCTTT	AGGTCGCAAC	300
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		GGTGGCATAG	TCATCCTGGA	GTCTTGCGGT	GGTGCACGCA	TCTGGGCTTT	AGGTCGCAAC	300
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		GGTGGCATAG	TCATCCTGGA	GTCTTGCGGT	GGTGCACGCA	TCTGGGCTTT	AGGTCGCAAC	300
	3,580		3,620		3,640			
NS1-5 M86379		GTGATCCGAG	CAGGAGGTGT	CACCGCAACC	CCAACCGGAG	GATGTGTTAG	GTTAATGGGA	360
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		GTGATCCGAG	CAGGAGGTGT	CACCGCAACC	CCAACCGGAG	GATGTGTTAG	GTTAATGGGA	360
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		GTGATCCGAG	CAGGAGGTGT	CACCGCAACC	CCAACCGGAG	GATGTGTTAG	GTTAATGGGA	360
	3,640		3,680		3,700			
NS1-5 M86379		TTATCTGCGC	CAACCATGCC	ATGGTCCGAG	ATCTTTTCGTG	AGCTCTTCTC	TCTCTTAGGT	420
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		TTATCTGCGC	CAACCATGCC	ATGGTCCGAG	ATCTTTTCGTG	AGCTCTTCTC	TCTCTTAGGT	420
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		TTATCTGCGC	CAACCATGCC	ATGGTCCGAG	ATCTTTTCGTG	AGCTCTTCTC	TCTCTTAGGT	420
	3,700		3,720		3,740			
NS1-5 M86379		AGAATTTGGT	CATCTGTCAA	AGTATCAGCC	CTAGTACTAA	CTGCTCTTGG	AATGTACGCA	480
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		AGAATTTGGT	CATCTGTCAA	AGTATCAGCC	CTAGTACTAA	CTGCTCTTGG	AATGTACGCA	480
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		AGAATTTGGT	CATCTGTCAA	AGTATCAGCC	CTAGTACTAA	CTGCTCTTGG	AATGTACGCA	480
	3,760		3,780		3,800			
NS1-5 M86379		TCTAGATTTA	GACCAAAATC	GGAAAGCAAAA	GGAAAAACCA	AATTGAAGAT	TGGACATAC	540
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		TCTAGATTTA	GACCAAAATC	GGAAAGCAAAA	GGAAAAACCA	AATTGAAGAT	TGGACATAC	540
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		TCTAGATTTA	GACCAAAATC	GGAAAGCAAAA	GGAAAAACCA	AATTGAAGAT	TGGACATAC	540
	3,820		3,840		3,860			
NS1-5 M86379		AGGGGTCGCG	GTGTAGCGCT	GACTGATGAC	GAGTACGATG	AGTGGCGCGA	ACACAACGCC	600
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		AGGGGTCGCG	GTGTAGCGCT	GACTGATGAC	GAGTACGATG	AGTGGCGCGA	ACACAACGCC	600
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		AGGGGTCGCG	GTGTAGCGCT	GACTGATGAC	GAGTACGATG	AGTGGCGCGA	ACACAACGCC	600
	3,880		3,900		3,920			
NS1-5 M86379		TCCAGAAAAT	TGGATTTGTC	AGTGGAGGAT	TTCTTAATGT	TGCGCCATCG	TGCCGCTCTA	660
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		TCCAGAAAAT	TGGATTTGTC	AGTGGAGGAT	TTCTTAATGT	TGCGCCATCG	TGCCGCTCTA	660
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		TCCAGAAAAT	TGGATTTGTC	AGTGGAGGAT	TTCTTAATGT	TGCGCCATCG	TGCCGCTCTA	660
	3,940		3,960		3,980			
NS1-5 M86379		GGAGCCGACG	ACAATGATGC	AGTAAAATTC	CGGTCGTGGT	GGAACTCCAG	AACCAAAATG	720
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		GGAGCCGACG	ACAATGATGC	AGTAAAATTC	CGGTCGTGGT	GGAACTCCAG	AACCAAAATG	720
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		GGAGCCGACG	ACAATGATGC	AGTAAAATTC	CGGTCGTGGT	GGAACTCCAG	AACCAAAATG	720
	4,000		4,020		4,040			
NS1-5 M86379		GCCAATGATT	ATGAGGATGT	CACCGTAATT	GGCAAAGGTG	GCGTCAAACA	TGAAAAGATC	780
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		GCCAATGATT	ATGAGGATGT	CACCGTAATT	GGCAAAGGTG	GCGTCAAACA	TGAAAAGATC	780
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		GCCAATGATT	ATGAGGATGT	CACCGTAATT	GGCAAAGGTG	GCGTCAAACA	TGAAAAGATC	780
	4,060		4,100					
NS1-5 M86379		AGAACCAATA	CCCTAAAAGC	TGTGGATCGT	GGTTATGACG	TCAGCTTTGC	TGAGGAA	837
Clona 1_pJET1.2-NS1-5		AGAACCAATA	CCCTAAAAGC	TGTGGATCGT	GGTTATGACG	TCAGCTTTGC	TGAGGAA	837
Clona 4_pJET1.2-NS1-5		AGAACCAATA	CCCTAAAAGC	TGTGGATCGT	GGTTATGACG	TCAGCTTTGC	TGAGGAA	837

Figura A2. Secuencias nucleotídicas parciales del fragmento codificante a NS1-5 de la región 3'. Al lado izquierdo de las secuencias nucleotídicas, se muestra la primer secuencia que corresponde a la obtenida en el Genbank con el número de acceso M86379, las siguientes secuencias, son las clonas 1 y 4. A la derecha, se especifica el número total de nucleótidos de las secuencias obtenidas. Se indica el número de nucleótido en la barra vertical superior en el alineamiento.

		20		40		60	
NS1-NS5	MSQTLSFVLK	THSVRKDFVH	SVKLTLARRR	DLQYIYNKLS	RTIRAEACPS	CASYDVCPNC	60
Clona 1	MSQTLSFVLK	THSVRKDFVH	SVKLTLARRR	DLQYIYNKLS	RTIRAEACPS	CASYDVCPNC	60
Clona 4	MSQTLSFVLK	THSVRKDFVH	SVKLTLARRR	DLQYIYNKLS	RTIRAEACPS	CASYDVCPNC	60
		80		100		120	
NS1-NS5	TSGDVPDDGS	STMSIPSWED	VTKSSTYSLL	LSEDTSDEL	PEDLVNVAAH	IRKALSTQSH	120
Clona 1	TSGDVPDDGS	STMSIPSWED	VTKSSTYSLL	LSEDTSDEL	PEDLVNVAAH	IRKALSTQSH	120
Clona 4	TSGDVPDDGS	STMSIPSWED	VTKSSTYSLL	LSEDTSDEL	PEDLVNVAAH	IRKALSTQSH	120
		140		160		180	
NS1-NS5	PANAEMCKEQ	LTFLVMAEA	MLPQRSRAS I	PLHQQHTAAR	LEWREKFFSK	PLDFLLERVG	180
Clona 1	PANAEMCKEQ	LTFLVMAEA	MLPQRSRAS I	PLHQQHTAAR	LEWREKFFSK	PLDFLLERVG	180
Clona 4	PANAEMCKEQ	LTFLVMAEA	MLPQRSRAS I	PLHQQHTAAR	LEWREKFFSK	PLDFLLERVG	180
		200		220		240	
NS1-NS5	VSKDILQTTA	IWKIILEKAC	YCKSYGEQWF	TAAKQKLREM	KNFESDTLKP	LIGGFIDGLR	240
Clona 1	VSKDILQTTA	IWKIILEKAC	YCKSYGEQWF	TAAKQKLREM	KNFESDTLKP	LIGGFIDGLR	240
Clona 4	VSKDILQTTA	IWKIILEKAC	YCKSYGEQWF	TAAKQKLREM	KNFESDTLKP	LIGGFIDGLR	240
		260		280			
NS1-NS5	FLTVDNPNPM	GFLPKLIGLV	KPLNLAMIID	NHENTISGWI	IT	282	
Clona 1	FLTVDNPNPM	GFLPKLIGLV	KPLNLAMIID	NHENTISGWI	IT	282	
Clona 4	FLTVDNPNPM	GFLPKLIGLV	KPLNLAMIID	NHENTISGWI	IT	282	

Figura A3. Secuencias del fragmento de la poliproteína NS1-5 desde la región amino terminal. Se muestran las secuencias de proteínas obtenidas a partir de la secuenciación de las clonas 1 y 4. Al lado izquierdo de las secuencias de las proteínas, se especifica la primer secuencia que corresponde a la obtenida en el Genbank, con el número de acceso M86379, las siguientes secuencias, son las clonas 1 y 4. A la derecha, se especifica el número total de aminoácidos de las secuencias obtenidas. El número de aminoácido se indica con la barra vertical superior en el alineamiento.

	800		820		840		
NS1-NS5	VNDSVRLDEL	PANQHVVTVN	SVFDLAWAVR	RHLTLAGQFQ	AIRAAAYDVL	VPDKIPAMLR 60	
Clona 1	VNDSVRLDEL	PANQHVVTVN	SVFDLAWAVR	RHLTLAGQFQ	AIRAAAYDVL	VPDKIPAMLR 60	
Clona 4	VNDSVRLDEL	PANQHVVTVN	SVFDLAWAVR	RHLTLAGQFQ	AIRAAAYDVL	VPDKIPAMLR 60	
	860		880		900		
NS1-NS5	HWMDETSFS	DHVVTQFVTP	GGIVILESCG	GARIWALGRN	VIRAGGV	PTGGCVRLMG 120	
Clona 1	HWMDETSFS	DHVVTQFVTP	GGIVILESCG	GARIWALGRN	VIRAGGV	PTGGCVRLMG 120	
Clona 4	HWMDETSFS	DHVVTQFVTP	GGIVILESCG	GARIWALGRN	VIRAGGV	PTGGCVRLMG 120	
	920		940		960		
NS1-NS5	LSAPTMPWSE	IFRELFSLG	RIWSSVKVSA	LVL	TALGMYA	SRFRPKSEAK	GKTKLKIGTY 180
Clona 1	LSAPTMPWSE	IFRELFSLG	RIWSSVKVSA	LVL	TALGMYA	SRFRPKSEAK	GKTKLKIGTY 180
Clona 4	LSAPTMPWSE	IFRELFSLG	RIWSSVKVSA	LVL	TALGMYA	SRFRPKSEAK	GKTKLKIGTY 180
	980		1,000		1,020		
NS1-NS5	RGRGVALTDD	EYDEWREHNA	SRKLDLSVED	FLMLRHRAAL	GADDNDAVKF	RSWWSRRTKM 240	
Clona 1	RGRGVALTDD	EYDEWREHNA	SRKLDLSVED	FLMLRHRAAL	GADDNDAVKF	RSWWSRRTKM 240	
Clona 4	RGRGVALTDD	EYDEWREHNA	SRKLDLSVED	FLMLRHRAAL	GADDNDAVKF	RSWWSRRTKM 240	
	1,040		1,060				
NS1-NS5	ANDYEDVTVI	GKGGVKHEKI	RTNTLKA	VDR	GYDVSFAEE	279	
Clona 1	ANDYEDVTVI	GKGGVKHEKI	RTNTLKA	VDR	GYDVSFAEE	279	
Clona 4	ANDYEDVTVI	GKGGVKHEKI	RTNTLKA	VDR	GYDVSFAEE	279	

Figura A4. Secuencias del fragmento de la poliproteína NS1-5 desde la región carboxilo terminal. Se muestran las secuencias de las proteínas obtenidas a partir de la secuenciación de las clonas 1 y 4. Al lado izquierdo de las secuencias, se especifica la primer secuencia que corresponde a la obtenida en el Genbank con el número de acceso M86379, las siguientes secuencias, son las clonas 1 y 4. A la derecha se indica el número total de aminoácidos. El número de aminoácido se muestra con la barra vertical superior en el alineamiento.

INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS POR LA EXPRESIÓN DEL ORF1 DEL CALICIVIRUS FELINO

		3,260		3,280		3,300	
NS6/7 M86379	TTGGATCTGT	CACAGATGTT	TGTGGGGAGC	ACAAAGGCTA	TTGCATCCAC	ATGGGCCACG	60
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TTGGATCTGT	CACAGATGTT	TGTGGGGAGC	ACAAAGGCTA	TTGCATCCAC	ATGGGCCACG	60
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TTGGATCTGT	CACAGATGTT	TGTGGGGAGC	ACAAAGGCTA	TTGCATCCAC	ATGGGCCACG	60
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TTGGATCTGT	CACAGATGTT	TGTGGGGAGC	ACAAAGGCTA	TTGCATCCAC	ATGGGCCACG	60
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TTGGATCTGT	CACAGATGTT	TGTGGGGAGC	ACAAAGGCTA	TTGCATCCAC	ATGGGCCACG	60
		3,320		3,340		3,360	
NS6/7 M86379	GTGTTTACGC	ATCCGTAGCT	CACGTGGTGA	AAGGGGATTC	ATTTTTCTTG	GGTGAAAGGA	120
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGTTTACGC	ATCCGTAGCT	CACGTGGTGA	AAGGGGATTC	ATTTTTCTTG	GGTGAAAGGA	120
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGTTTACGC	ATCCGTAGCT	CACGTGGTGA	AAGGGGATTC	ATTTTTCTTG	GGTGAAAGGA	120
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGTTTACGC	ATCCGTAGCT	CACGTGGTGA	AAGGGGATTC	ATTTTTCTTG	GGTGAAAGGA	120
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGTTTACGC	ATCCGTAGCT	CACGTGGTGA	AAGGGGATTC	ATTTTTCTTG	GGTGAAAGGA	120
		3,380		3,400		3,420	
NS6/7 M86379	TTTTTGATCT	TAAGACTAAT	GGTGAATTTT	GCTGCTTTTCG	CAGCACGAAA	ATTCTACCTA	180
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TTTTTGATCT	TAAGACTAAT	GGTGAATTTT	GCTGCTTTTCG	CAGCACGAAA	ATTCTACCTA	180
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TTTTTGATCT	TAAGACTAAT	GGTGAATTTT	GCTGCTTTTCG	CAGCACGAAA	ATTCTACCTA	180
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TTTTTGATCT	TAAGACTAAT	GGTGAATTTT	GCTGCTTTTCG	CAGCACGAAA	ATTCTACCTA	180
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TTTTTGATCT	TAAGACTAAT	GGTGAATTTT	GCTGCTTTTCG	CAGCACGAAA	ATTCTACCTA	180
		3,440		3,460		3,480	
NS6/7 M86379	GTGCTGCACC	TTTCTTTTCT	GGGAAGCCCA	CTCGTGATCC	GTGGGGATCC	CCCGTGGCAA	240
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGCTGCACC	TTTCTTTTCT	GGGAAGCCCA	CTCGTGATCC	GTGGGGATCC	CCCGTGGCAA	240
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGCTGCACC	TTTCTTTTCT	GGGAAGCCCA	CTCGTGATCC	GTGGGGATCC	CCCGTGGCAA	240
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGCTGCACC	TTTCTTTTCT	GGGAAGCCCA	CTCGTGATCC	GTGGGGATCC	CCCGTGGCAA	240
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGCTGCACC	TTTCTTTTCT	GGGAAGCCCA	CTCGTGATCC	GTGGGGATCC	CCCGTGGCAA	240
		3,500		3,520		3,540	
NS6/7 M86379	CTGAGTGGAA	GCCTAAAATG	TACACAACAA	CCTCTGGAAA	GATTCTGGGG	TGCTTTGCAA	300
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	CTGAGTGGAA	GCCTAAAATG	TACACAACAA	CCTCTGGAAA	GATTCTGGGG	TGCTTTGCAA	300
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	CTGAGTGGAA	GCCTAAAATG	TACACAACAA	CCTCTGGAAA	GATTCTGGGG	TGCTTTGCAA	300
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	CTGAGTGGAA	GCCTAAAATG	TACACAACAA	CCTCTGGAAA	GATTCTGGGG	TGCTTTGCAA	300
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	CTGAGTGGAA	GCCTAAAATG	TACACAACAA	CCTCTGGAAA	GATTCTGGGG	TGCTTTGCAA	300
		3,560		3,580		3,600	
NS6/7 M86379	CAACTTCAAC	TGAAACTCAC	CCGGGAGACT	GTGGCCTCCC	ATATATTGAT	GACAACGGGA	360
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	CAACTTCAAC	TGAAACTCAC	CCGGGAGACT	GTGGCCTCCC	ATATATTGAT	GACAACGGGA	360
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	CAACTTCAAC	TGAAACTCAC	CCGGGAGACT	GTGGCCTCCC	ATATATTGAT	GACAACGGGA	360
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	CAACTTCAAC	TGAAACTCAC	CCGGGAGACT	GTGGCCTCCC	ATATATTGAT	GACAACGGGA	360
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	CAACTTCAAC	TGAAACTCAC	CCGGGAGACT	GTGGCCTCCC	ATATATTGAT	GACAACGGGA	360
		3,620		3,640		3,660	
NS6/7 M86379	GGGTGACCGG	CCTCCACACT	GGCTCTGGGG	GACCCAAAAC	CCCAAGTGCC	AAGTTGGTGG	420
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	GGGTGACCGG	CCTCCACACT	GGCTCTGGGG	GACCCAAAAC	CCCAAGTGCC	AAGTTGGTGG	420
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	GGGTGACCGG	CCTCCACACT	GGCTCTGGGG	GACCCAAAAC	CCCAAGTGCC	AAGTTGGTGG	420
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	GGGTGACCGG	CCTCCACACT	GGCTCTGGGG	GACCCAAAAC	CCCAAGTGCC	AAGTTGGTGG	420
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	GGGTGACCGG	CCTCCACACT	GGCTCTGGGG	GACCCAAAAC	CCCAAGTGCC	AAGTTGGTGG	420
		3,680		3,700		3,720	
NS6/7 M86379	TGCCATATGT	GCATATTGAC	ATGAAGACTA	AATCCGTCAC	TGCTCAAAAAG	TATGACGTAA	480
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TGCCATATGT	GCATATTGAC	ATGAAGACTA	AATCCGTCAC	TGCTCAAAAAG	TATGACGTAA	480
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TGCCATATGT	GCATATTGAC	ATGAAGACTA	AATCCGTCAC	TGCTCAAAAAG	TATGACGTAA	480
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TGCCATATGT	GCATATTGAC	ATGAAGACTA	AATCCGTCAC	TGCTCAAAAAG	TATGACGTAA	480
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TGCCATATGT	GCATATTGAC	ATGAAGACTA	AATCCGTCAC	TGCTCAAAAAG	TATGACGTAA	480
		3,740		3,760		3,780	
NS6/7 M86379	CAAAGCCTGA	TATAAGTTAC	AAAGGCTTAA	TTTGTAAGCA	ATTGGATGAG	ATTAGGATTA	540
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	CAAAGCCTGA	TATAAGTTAC	AAAGGCTTAA	TTTGTAAGCA	ATTGGATGAA	ATTAGGATTA	540
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	CAAAGCCTGA	TATAAGTTAC	AAAGGCTTAA	TTTGTAAGCA	ATTGGATGAA	ATTAGGATTA	540
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	CAAAGCCTGA	TATAAGTTAC	AAAGGCTTAA	TTTGTAAGCA	ATTGGATGAA	ATTAGGATTA	540
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	CAAAGCCTGA	TATAAGTTAC	AAAGGCTTAA	TTTGTAAGCA	ATTGGATGAA	ATTAGGATTA	540
		3,800		3,820		3,840	
NS6/7 M86379	TACCAAAAAGG	CACACGTCTC	CATGTCTCCC	CAGCCCACAC	TGAGGATTAT	CAAGAATGCT	600
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TACCAAAAAGG	CACACGTCTC	CATGTCTCCC	CAGCCCACAC	TGAGGATTAT	CAAGAATGCT	600
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TACCAAAAAGG	CACACGTCTC	CATGTCTCCC	CAGCCCACAC	TGAGGATTAT	CAAGAATGCT	600
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TACCAAAAAGG	CACACGTCTC	CATGTCTCCC	CAGCCCACAC	TGAGGATTAT	CAAGAATGCT	600
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TACCAAAAAGG	CACACGTCTC	CATGTCTCCC	CAGCCCACAC	TGAGGATTAT	CAAGAATGCT	600

INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS POR LA EXPRESIÓN DEL ORF1 DEL CALICIVIRUS FELINO

		3,260		3,280		3,300	
NS6/7 M86379	TTGGATCTGT	CACAGATGTT	TGTGGGGAGC	ACAAAGGCTA	TTGCATCCAC	ATGGGCCACG	60
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TTGGATCTGT	CACAGATGTT	TGTGGGGAGC	ACAAAGGCTA	TTGCATCCAC	ATGGGCCACG	60
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TTGGATCTGT	CACAGATGTT	TGTGGGGAGC	ACAAAGGCTA	TTGCATCCAC	ATGGGCCACG	60
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TTGGATCTGT	CACAGATGTT	TGTGGGGAGC	ACAAAGGCTA	TTGCATCCAC	ATGGGCCACG	60
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TTGGATCTGT	CACAGATGTT	TGTGGGGAGC	ACAAAGGCTA	TTGCATCCAC	ATGGGCCACG	60
		3,320		3,340		3,360	
NS6/7 M86379	GTGTTTACGC	ATCCGTAGCT	CACGTGGTGA	AAGGGGATTC	ATTTTTCTTG	GGTGAAAGGA	120
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGTTTACGC	ATCCGTAGCT	CACGTGGTGA	AAGGGGATTC	ATTTTTCTTG	GGTGAAAGGA	120
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGTTTACGC	ATCCGTAGCT	CACGTGGTGA	AAGGGGATTC	ATTTTTCTTG	GGTGAAAGGA	120
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGTTTACGC	ATCCGTAGCT	CACGTGGTGA	AAGGGGATTC	ATTTTTCTTG	GGTGAAAGGA	120
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGTTTACGC	ATCCGTAGCT	CACGTGGTGA	AAGGGGATTC	ATTTTTCTTG	GGTGAAAGGA	120
		3,380		3,400		3,420	
NS6/7 M86379	TTTTTGATCT	TAAGACTAAT	GGTGAATTTT	GCTGCTTTTCG	CAGCACGAAA	ATTCTACCTA	180
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TTTTTGATCT	TAAGACTAAT	GGTGAATTTT	GCTGCTTTTCG	CAGCACGAAA	ATTCTACCTA	180
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TTTTTGATCT	TAAGACTAAT	GGTGAATTTT	GCTGCTTTTCG	CAGCACGAAA	ATTCTACCTA	180
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TTTTTGATCT	TAAGACTAAT	GGTGAATTTT	GCTGCTTTTCG	CAGCACGAAA	ATTCTACCTA	180
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TTTTTGATCT	TAAGACTAAT	GGTGAATTTT	GCTGCTTTTCG	CAGCACGAAA	ATTCTACCTA	180
		3,440		3,460		3,480	
NS6/7 M86379	GTGCTGCACC	TTTCTTTTCT	GGGAAGCCCA	CTCGTGATCC	GTGGGGATCC	CCCGTGGCAA	240
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGCTGCACC	TTTCTTTTCT	GGGAAGCCCA	CTCGTGATCC	GTGGGGATCC	CCCGTGGCAA	240
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGCTGCACC	TTTCTTTTCT	GGGAAGCCCA	CTCGTGATCC	GTGGGGATCC	CCCGTGGCAA	240
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGCTGCACC	TTTCTTTTCT	GGGAAGCCCA	CTCGTGATCC	GTGGGGATCC	CCCGTGGCAA	240
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGCTGCACC	TTTCTTTTCT	GGGAAGCCCA	CTCGTGATCC	GTGGGGATCC	CCCGTGGCAA	240
		3,500		3,520		3,540	
NS6/7 M86379	CTGAGTGGAA	GCCTAAAATG	TACACAACAA	CCTCTGGAAA	GATTCTGGGG	TGCTTTGCAA	300
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	CTGAGTGGAA	GCCTAAAATG	TACACAACAA	CCTCTGGAAA	GATTCTGGGG	TGCTTTGCAA	300
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	CTGAGTGGAA	GCCTAAAATG	TACACAACAA	CCTCTGGAAA	GATTCTGGGG	TGCTTTGCAA	300
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	CTGAGTGGAA	GCCTAAAATG	TACACAACAA	CCTCTGGAAA	GATTCTGGGG	TGCTTTGCAA	300
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	CTGAGTGGAA	GCCTAAAATG	TACACAACAA	CCTCTGGAAA	GATTCTGGGG	TGCTTTGCAA	300
		3,560		3,580		3,600	
NS6/7 M86379	CAACTTCAAC	TGAAACTCAC	CCGGGAGACT	GTGGCCTCCC	ATATATTGAT	GACAACGGGA	360
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	CAACTTCAAC	TGAAACTCAC	CCGGGAGACT	GTGGCCTCCC	ATATATTGAT	GACAACGGGA	360
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	CAACTTCAAC	TGAAACTCAC	CCGGGAGACT	GTGGCCTCCC	ATATATTGAT	GACAACGGGA	360
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	CAACTTCAAC	TGAAACTCAC	CCGGGAGACT	GTGGCCTCCC	ATATATTGAT	GACAACGGGA	360
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	CAACTTCAAC	TGAAACTCAC	CCGGGAGACT	GTGGCCTCCC	ATATATTGAT	GACAACGGGA	360
		3,620		3,640		3,660	
NS6/7 M86379	GGGTGACCGG	CCTCCACACT	GGCTCTGGGG	GACCCAAAAC	CCCAAGTGCC	AAGTTGGTGG	420
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	GGGTGACCGG	CCTCCACACT	GGCTCTGGGG	GACCCAAAAC	CCCAAGTGCC	AAGTTGGTGG	420
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	GGGTGACCGG	CCTCCACACT	GGCTCTGGGG	GACCCAAAAC	CCCAAGTGCC	AAGTTGGTGG	420
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	GGGTGACCGG	CCTCCACACT	GGCTCTGGGG	GACCCAAAAC	CCCAAGTGCC	AAGTTGGTGG	420
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	GGGTGACCGG	CCTCCACACT	GGCTCTGGGG	GACCCAAAAC	CCCAAGTGCC	AAGTTGGTGG	420
		3,680		3,700		3,720	
NS6/7 M86379	TGCCATATGT	GCATATTGAC	ATGAAGACTA	AATCCGTCAC	TGCTCAAAGG	TATGACGTAA	480
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TGCCATATGT	GCATATTGAC	ATGAAGACTA	AATCCGTCAC	TGCTCAAAGG	TATGACGTAA	480
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TGCCATATGT	GCATATTGAC	ATGAAGACTA	AATCCGTCAC	TGCTCAAAGG	TATGACGTAA	480
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TGCCATATGT	GCATATTGAC	ATGAAGACTA	AATCCGTCAC	TGCTCAAAGG	TATGACGTAA	480
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TGCCATATGT	GCATATTGAC	ATGAAGACTA	AATCCGTCAC	TGCTCAAAGG	TATGACGTAA	480
		3,740		3,760		3,780	
NS6/7 M86379	CAAAGCCTGA	TATAAGTTAC	AAAGGCTTAA	TTTGTAAGCA	ATTGGATGAG	ATTAGGATTA	540
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	CAAAGCCTGA	TATAAGTTAC	AAAGGCTTAA	TTTGTAAGCA	ATTGGATGAG	ATTAGGATTA	540
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	CAAAGCCTGA	TATAAGTTAC	AAAGGCTTAA	TTTGTAAGCA	ATTGGATGAG	ATTAGGATTA	540
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	CAAAGCCTGA	TATAAGTTAC	AAAGGCTTAA	TTTGTAAGCA	ATTGGATGAG	ATTAGGATTA	540
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	CAAAGCCTGA	TATAAGTTAC	AAAGGCTTAA	TTTGTAAGCA	ATTGGATGAG	ATTAGGATTA	540
		3,800		3,820		3,840	
NS6/7 M86379	TACCAAAAAGG	CACACGTCTC	CATGTCTCCC	CAGCCCACAC	TGAGGATTAT	CAAGAATGCT	600
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TACCAAAAAGG	CACACGTCTC	CATGTCTCCC	CAGCCCACAC	TGAGGATTAT	CAAGAATGCT	600
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TACCAAAAAGG	CACACGTCTC	CATGTCTCCC	CAGCCCACAC	TGAGGATTAT	CAAGAATGCT	600
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TACCAAAAAGG	CACACGTCTC	CATGTCTCCC	CAGCCCACAC	TGAGGATTAT	CAAGAATGCT	600
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TACCAAAAAGG	CACACGTCTC	CATGTCTCCC	CAGCCCACAC	TGAGGATTAT	CAAGAATGCT	600
		3,860		3,880		3,900	
NS6/7 M86379	CACACCAACC	CGCATCACTT	GGAAGCGGGG	ATCCCCGCTG	TCCAAAATCT	CTCACTGCTA	660
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	CACACCAACC	CGCATCACTT	GGAAGCGGGG	ATCCCCGCTG	TCCAAAATCT	CTCACTGCTA	660
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	CACACCAACC	CGCATCACTT	GGAAGCGGGG	ATCCCCGCTG	TCCAAAATCT	CTCACTGCTA	660
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	CACACCAACC	CGCATCACTT	GGAAGCGGGG	ATCCCCGCTG	TCCAAAATCT	CTCACTGCTA	660
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	CACACCAACC	CGCATCACTT	GGAAGCGGGG	ATCCCCGCTG	TCCAAAATCT	CTCACTGCTA	660
		3,920		3,940		3,960	
NS6/7 M86379	TAGTTGTTGA	TTCTCTAAAA	CCATACTGTG	AGAACGTTGA	GGTCTCTCCA	CATGATGTTT	720
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TAGTTGTTGA	TTCTCTAAAA	CCATACTGTG	AGAACGTTGA	GGTCTCTCCA	CATGATGTTT	720
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TAGTTGTTGA	TTCTCTAAAA	CCATACTGTG	AGAACGTTGA	GGTCTCTCCA	CATGATGTTT	720
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TAGTTGTTGA	TTCTCTAAAA	CCATACTGTG	AGAACGTTGA	GGTCTCTCCA	CATGATGTTT	720
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TAGTTGTTGA	TTCTCTAAAA	CCATACTGTG	AGAACGTTGA	GGTCTCTCCA	CATGATGTTT	720

INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS POR LA EXPRESIÓN DEL ORF1 DEL CALICIVIRUS FELINO

		3,980		4,000		4,020	
NS6/7 M86379	TGCACAGAGT	TCAAAAGATG	CTTATCGACC	ACCTTTCAGG	CTTTGTCCCT	ATGAACATTT	780
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TGCACAGAGT	TCAAAAGATG	CTTATCGACC	ACCTTTCAGG	CTTTGTCCCT	ATGAACATTT	780
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TGCACAGAGT	TCAAAAGATG	CTTATCGACC	ACCTTTCAGG	CTTTGTCCCT	ATGAACATTT	780
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TGCACAGAGT	TCAAAAGATG	CTTATCGACC	ACCTTTCAGG	CTTTGTCCCT	ATGAACATTT	780
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TGCACAGAGT	TCAAAAGATG	CTTATCGACC	ACCTTTCAGG	CTTTGTCCCT	ATGAACATTT	780
		4,040		4,060		4,080	
NS6/7 M86379	CCTCGGAAAC	CTCTATGCTC	TCAGCTTTCC	ACAAACTCAA	TCATGATACT	TCCTGTGGAC	840
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	CCTCGGAAAC	CTCTATGCTC	TCAGCTTTCC	ACAAACTCAA	TCATGATACT	TCCTGTGGAC	840
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	CCTCGGAAAC	CTCTATGCTC	TCAGCTTTCC	ACAAACTCAA	TCATGATACT	TCCTGTGGAC	840
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	CCTCGGAAAC	CTCTATGCTC	TCAGCTTTCC	ACAAACTCAA	TCATGATACT	TCCTGTGGAC	840
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	CCTCGGAAAC	CTCTATGCTC	TCAGCTTTCC	ACAAACTCAA	TCATGATACT	TCCTGTGGAC	840
		4,100		4,120		4,140	
NS6/7 M86379	CATACTTGGG	TGGCAGAAAG	AAAGATCACA	TGGCTAACGG	TGAGCCGGAC	AAGCAGTTAT	900
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	CATACTTGGG	TGGCAGAAAG	AAAGATCACA	TGGCTAACGG	TGAGCCGGAC	AAGCAGTTAT	900
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	CATACTTGGG	TGGCAGAAAG	AAAGATCACA	TGGCTAACGG	TGAGCCGGAC	AAGCAGTTAT	900
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	CATACTTGGG	TGGCAGAAAG	AAAGATCACA	TGGCTAACGG	TGAGCCGGAC	AAGCAGTTAT	900
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	CATACTTGGG	TGGCAGAAAG	AAAGATCACA	TGGCTAACGG	TGAGCCGGAC	AAGCAGTTAT	900
		4,180		4,180		4,200	
NS6/7 M86379	TGGATCTCCT	GTCTGCAAAA	TGGAAATTGG	CAACCCAAGG	CATAGCACTA	CCACATGAGT	960
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TGGATCTCCT	GTCTGCAAAA	TGGAAATTGG	CAACCCAAGG	CATAGCACTA	CCACATGAGT	960
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TGGATCTCCT	GTCTGCAAAA	TGGAAATTGG	CAACCCAAGG	CATAGCACTA	CCACATGAGT	960
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TGGATCTCCT	GTCTGCAAAA	TGGAAATTGG	CAACCCAAGG	CATAGCACTA	CCACATGAGT	960
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TGGATCTCCT	GTCTGCAAAA	TGGAAATTGG	CAACCCAAGG	CATAGCACTA	CCACATGAGT	960
		4,220		4,240		4,260	
NS6/7 M86379	ACACAATTGG	GCTAAAGGAC	GAGTTAAGGC	CCGTGGAGAA	GGTTAGTGAA	GGGAAGAGAA	1020
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	ACACAATTGG	GCTAAAGGAC	GAGTTAAGGC	CCGTGGAGAA	GGTTAGTGAA	GGGAAGAGAA	1020
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	ACACAATTGG	GCTAAAGGAC	GAGTTAAGGC	CCGTGGAGAA	GGTTAGTGAA	GGGAAGAGAA	1020
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	ACACAATTGG	GCTAAAGGAC	GAGTTAAGGC	CCGTGGAGAA	GGTTAGTGAA	GGGAAGAGAA	1020
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	ACACAATTGG	GCTAAAGGAC	GAGTTAAGGC	CCGTGGAGAA	GGTTAGTGAA	GGGAAGAGAA	1020
		4,280		4,300		4,320	
NS6/7 M86379	GGATGATTTG	GGGTTGTGAT	GTTGGCGTCG	CTACTGTCTG	TGCAGCTGCG	TTC AAGGGTG	1080
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	GGATGATTTG	GGGTTGTGAT	GTTGGCGTCG	CTACTGTCTG	TGCAGCTGCG	TTC AAGGGTG	1080
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	GGATGATTTG	GGGTTGTGAT	GTTGGCGTCG	CTACTGTCTG	TGCAGCTGCG	TTC AAGGGTG	1080
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	GGATGATTTG	GGGTTGTGAT	GTTGGCGTCG	CTACTGTCTG	TGCAGCTGCG	TTC AAGGGTG	1080
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	GGATGATTTG	GGGTTGTGAT	GTTGGCGTCG	CTACTGTCTG	TGCAGCTGCG	TTC AAGGGTG	1080
		4,340		4,360		4,380	
NS6/7 M86379	TTAGCGATGC	CATCACAGCA	AACCACCAGT	ACGGGCCAT	ACAGGTTGGT	ATCAACATGG	1140
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TTAGCGATGC	CATCACAGCA	AACCACCAGT	ACGGGCCAT	ACAGGTTGGT	ATCAACATGG	1140
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TTAGCGATGC	CATCACAGCA	AACCACCAGT	ACGGGCCAT	ACAGGTTGGT	ATCAACATGG	1140
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TTAGCGATGC	CATCACAGCA	AACCACCAGT	ACGGGCCAT	ACAGGTTGGT	ATCAACATGG	1140
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TTAGCGATGC	CATCACAGCA	AACCACCAGT	ACGGGCCAT	ACAGGTTGGT	ATCAACATGG	1140
		4,400		4,420		4,440	
NS6/7 M86379	ATAGCCCCAG	CGTCGAAGCG	CTGTTCCAAA	GGATCAAAAAG	CGCGGCCAAG	GTATTTGCGG	1200
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	ATAGCCCCAG	CGTCGAAGCG	CTGTTCCAAA	GGATCAAAAAG	CGCGGCCAAG	GTATTTGCGG	1200
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	ATAGCCCCAG	CGTCGAAGCG	CTGTTCCAAA	GGATCAAAAAG	CGCGGCCAAG	GTATTTGCGG	1200
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	ATAGCCCCAG	CGTCGAAGCG	CTGTTCCAAA	GGATCAAAAAG	CGCGGCCAAG	GTATTTGCGG	1200
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	ATAGCCCCAG	CGTCGAAGCG	CTGTTCCAAA	GGATCAAAAAG	CGCGGCCAAG	GTATTTGCGG	1200
		4,460		4,480		4,500	
NS6/7 M86379	TCGATTATTC	CAAAATGGGAT	TCGACCCAAT	CGCCTCGTGT	CAGTGCAGCT	TCAATTGACA	1260
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TCGATTATTC	CAAAATGGGAT	TCGACCCAAT	CGCCTCGTGT	CAGTGCAGCT	TCAATTGACA	1260
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TCGATTATTC	CAAAATGGGAT	TCGACCCAAT	CGCCTCGTGT	CAGTGCAGCT	TCAATTGACA	1260
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TCGATTATTC	CAAAATGGGAT	TCGACCCAAT	CGCCTCGTGT	CAGTGCAGCT	TCAATTGACA	1260
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TCGATTATTC	CAAAATGGGAT	TCGACCCAAT	CGCCTCGTGT	CAGTGCAGCT	TCAATTGACA	1260
		4,520		4,540		4,560	
NS6/7 M86379	TCCTTCGTTA	CTTTCCGAT	CGCTCTCCAA	TTGTTGACTC	AGCCTCTAAC	ACACTGAAGA	1320
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TCCTTCGTTA	CTTTCCGAT	CGCTCTCCAA	TTGTTGACTC	AGCCTCTAAC	ACACTGAAGA	1320
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TCCTTCGTTA	CTTTCCGAT	CGCTCTCCAA	TTGTTGACTC	AGCCTCTAAC	ACACTGAAGA	1320
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TCCTTCGTTA	CTTTCCGAT	CGCTCTCCAA	TTGTTGACTC	AGCCTCTAAC	ACACTGAAGA	1320
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TCCTTCGTTA	CTTTCCGAT	CGCTCTCCAA	TTGTTGACTC	AGCCTCTAAC	ACACTGAAGA	1320
		4,580		4,600		4,620	
NS6/7 M86379	GCCCTCCTGT	TGCAATCTTT	AATGGTGTGG	CTGTAAAAGT	GTCCTCTGGC	TTACCATCTG	1380
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	GCCCTCCTGT	TGCAATCTTT	AATGGTGTGG	CTGTAAAAGT	GTCCTCTGGC	TTACCATCTG	1380
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	GCCCTCCTGT	TGCAATCTTT	AATGGTGTGG	CTGTAAAAGT	GTCCTCTGGC	TTACCATCTG	1380
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	GCCCTCCTGT	TGCAATCTTT	AATGGTGTGG	CTGTAAAAGT	GTCCTCTGGC	TTACCATCTG	1380
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	GCCCTCCTGT	TGCAATCTTT	AATGGTGTGG	CTGTAAAAGT	GTCCTCTGGC	TTACCATCTG	1380
		4,640		4,660		4,680	
NS6/7 M86379	GAATGCCCTCT	TACCTCAGTA	ATCAATTCCC	TTAATCATTG	TCTGTATGTT	GGGTGTGCCA	1440
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	GAATGCCCTCT	TACCTCAGTA	ATCAATTCCC	TTAATCATTG	TCTGTATGTT	GGGTGTGCCA	1440
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	GAATGCCCTCT	TACCTCAGTA	ATCAATTCCC	TTAATCATTG	TCTGTATGTT	GGGTGTGCCA	1440
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	GAATGCCCTCT	TACCTCAGTA	ATCAATTCCC	TTAATCATTG	TCTGTATGTT	GGGTGTGCCA	1440
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	GAATGCCCTCT	TACCTCAGTA	ATCAATTCCC	TTAATCATTG	TCTGTATGTT	GGGTGTGCCA	1440

		4,700		4,720		4,740	
NS6/7 M86379	TTCTTCAATC	CCTAGAAGCT	AAGGCCATTG	CCGTCAC TTG	GAACCTTTTC	TCAACTTTTG	1500
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TTCTTCAATC	CCTAGAAGCT	AAGGCCATTG	CCGTCAC TTG	GAACCTTTTC	TCAACTTTTG	1500
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TTCTTCAATC	CCTAGAAGCT	AAGGCCATTG	CCGTCAC TTG	GAACCTTTTC	TCAACTTTTG	1500
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TTCTTCAATC	CCTAGAAGCT	AAGGCCATTG	CCGTCAC TTG	GAACCTTTTC	TCAACTTTTG	1500
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TTCTTCAATC	CCTAGAAGCT	AAGGCCATTG	CCGTCAC TTG	GAACCTTTTC	TCAACTTTTG	1500
		4,760		4,780		4,800	
NS6/7 M86379	ATATCATGAC	TTACGGGGAT	GATGGTGTCT	ACATGTTTCC	TATTATGTAT	GCAAGTATTA	1560
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	ATATCATGAC	TTACGGGGAT	GATGGTGTCT	ACATGTTTCC	TATTATGTAT	GCAAGTATTA	1560
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	ATATCATGAC	TTACGGGGAT	GATGGTGTCT	ACATGTTTCC	TATTATGTAT	GCAAGTATTA	1560
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	ATATCATGAC	TTACGGGGAT	GATGGTGTCT	ACATGTTTCC	TATTATGTAT	GCAAGTATTA	1560
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	ATATCATGAC	TTACGGGGAT	GATGGTGTCT	ACATGTTTCC	TATTATGTAT	GCAAGTATTA	1560
		4,820		4,840		4,860	
NS6/7 M86379	GTGACCAAAT	TTTTGGAAAT	CTTTCTTCCT	ATGGCCTGAA	ACCAACTCGG	GTTGACAAGT	1620
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGACCAAAT	TTTTGGAAAT	CTTTCTTCCT	ATGGCCTGAA	ACCAACTCGG	GTTGACAAGT	1620
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGACCAAAT	TTTTGGAAAT	CTTTCTTCCT	ATGGCCTGAA	ACCAACTCGG	GTTGACAAGT	1620
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGACCAAAT	TTTTGGAAAT	CTTTCTTCCT	ATGGCCTGAA	ACCAACTCGG	GTTGACAAGT	1620
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	GTGACCAAAT	TTTTGGAAAT	CTTTCTTCCT	ATGGCCTGAA	ACCAACTCGG	GTTGACAAGT	1620
		4,880		4,900		4,920	
NS6/7 M86379	CCGTTGGAGC	AATTGAGCCT	ATTGATCCTG	ACTCTGTTGT	TTTCTTGAAG	AGAACAATCA	1680
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	CCGTTGGAGC	AATTGAGCCT	ATTGATCCTG	ACTCTGTTGT	TTTCTTGAAG	AGAACAATCA	1680
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	CCGTTGGAGC	AATTGAGCCT	ATTGATCCTG	ACTCTGTTGT	TTTCTTGAAG	AGAACAATCA	1680
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	CCGTTGGAGC	AATTGAGCCT	ATTGATCCTG	ACTCTGTTGT	TTTCTTGAAG	AGAACAATCA	1680
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	CCGTTGGAGC	AATTGAGCCT	ATTGATCCTG	ACTCTGTTGT	TTTCTTGAAG	AGAACAATCA	1680
		4,940		4,960		4,980	
NS6/7 M86379	CAAGGACACC	TCAGGGGATA	AGGGGTTTAC	TTGATCGCAG	CTCTATAATA	AGACAATTCT	1740
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	CAAGGACACC	TCAGGGGATA	AGGGGTTTAC	TTGATCGCAG	CTCTATAATA	AGACAATTCT	1740
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	CAAGGACACC	TCAGGGGATA	AGGGGTTTAC	TTGATCGCAG	CTCTATAATA	AGACAATTCT	1740
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	CAAGGACACC	TCAGGGGATA	AGGGGTTTAC	TTGATCGCAG	CTCTATAATA	AGACAATTCT	1740
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	CAAGGACACC	TCAGGGGATA	AGGGGTTTAC	TTGATCGCAG	CTCTATAATA	AGACAATTCT	1740
		5,000		5,020		5,040	
NS6/7 M86379	ATTATATTAA	AGGTGAGAAC	TCCGATGACT	GGAAGAGCCC	CCCCAAAACAT	ATTGACCCAA	1800
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	ATTATATTAA	AGGTGAGAAC	TCCGATGACT	GGAAGAGCCC	CCCCAAAACAT	ATTGACCCAA	1800
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	ATTATATTAA	AGGTGAGAAC	TCCGATGACT	GGAAGAGCCC	CCCCAAAACAT	ATTGACCCAA	1800
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	ATTATATTAA	AGGTGAGAAC	TCCGATGACT	GGAAGAGCCC	CCCCAAAACAT	ATTGACCCAA	1800
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	ATTATATTAA	AGGTGAGAAC	TCCGATGACT	GGAAGAGCCC	CCCCAAAACAT	ATTGACCCAA	1800
		5,060		5,080		5,100	
NS6/7 M86379	CATCTCGAGG	GCAACAGCTT	TGGAATGCCT	GTCTGTACGC	TAGCCAACAT	GGCTTGGAGT	1860
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	CATCTCGAGG	GCAACAGCTT	TGGAATGCCT	GTCTGTACGC	TAGCCAACAT	GGCTTGGAGT	1860
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	CATCTCGAGG	GCAACAGCTT	TGGAATGCCT	GTCTGTACGC	TAGCCAACAT	GGCTTGGAGT	1860
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	CATCTCGAGG	GCAACAGCTT	TGGAATGCCT	GTCTGTACGC	TAGCCAACAT	GGCTTGGAGT	1860
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	CATCTCGAGG	GCAACAGCTT	TGGAATGCCT	GTCTGTACGC	TAGCCAACAT	GGCTTGGAGT	1860
		5,120		5,140		5,160	
NS6/7 M86379	TTTTCAACAA	GGTTTACAGG	CTGGCCGAGA	GGGCTGTTGA	ATATGAAGAG	CTGCAC TTG	1920
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	TTTTCAACAA	GGTTTACAGG	CTGGCCGAGA	GGGCTGTTGA	ATATGAAGAG	CTGCAC TTG	1920
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	TTTTCAACAA	GGTTTACAGG	CTGGCCGAGA	GGGCTGTTGA	ATATGAAGAG	CTGCAC TTG	1920
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	TTTTCAACAA	GGTTTACAGG	CTGGCCGAGA	GGGCTGTTGA	ATATGAAGAG	CTGCAC TTG	1920
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	TTTTCAACAA	GGTTTACAGG	CTGGCCGAGA	GGGCTGTTGA	ATATGAAGAG	CTGCAC TTG	1920
		5,180		5,200		5,220	
NS6/7 M86379	AACCCCAAC	ATATGCTTCG	GCTTTGGATC	ATTACAACAG	CCAGTTCAAT	GGCGTGGAGG	1980
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	AACCCCAAC	ATATGCTTCG	GCTTTGGATC	ATTACAACAG	CCAGTTCAAT	GGCGTGGAGG	1980
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	AACCCCAAC	ATATGCTTCG	GCTTTGGATC	ATTACAACAG	CCAGTTCAAT	GGCGTGGAGG	1980
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	AACCCCAAC	ATATGCTTCG	GCTTTGGATC	ATTACAACAG	CCAGTTCAAT	GGCGTGGAGG	1980
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	AACCCCAAC	ATATGCTTCG	GCTTTGGATC	ATTACAACAG	CCAGTTCAAT	GGCGTGGAGG	1980
		5,240					
NS6/7 M86379	CGCGGTC TGA	CCAGATCGAC	T CGAGT G	2007			
Clona 1_pDsRed2-N1-NS6/7	CGCGGTC TGA	CCAGATCGAC	T CGAGT G	2007			
Clona 2_pDsRed2-N1-NS6/7	CGCGGTC TGA	CCAGATCGAC	T CGAGT G	2007			
Clona 3_pDsRed2-N1-NS6/7	CGCGGTC TGA	CCAGATCGAC	T CGAGT G	2007			
Clona 4_pDsRed2-N1-NS6/7	CGCGGTC TGA	CCAGATCGAC	T CGAGT G	2007			

Figura A5. Secuencias del fragmento codificante a NS6/7 desde la región 5'.

Se especifica la primer secuencia que corresponde a la obtenida en el Genbank con el número de acceso M86379, las siguientes secuencias, son las clonas 1 a 4. A la derecha, se indica el número total de aminoácidos de las secuencias y, el número de nucleótido, con la barra vertical superior en el alineamiento.

INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS POR LA EXPRESIÓN DEL ORF1 DEL CALICIVIRUS FELINO

NS6/7	GSVTDVCGEH	KGYC IHMGHG	VYASVAHVVK	GDSFFLGERI	FDLKTNGEFC	CFRSTKILPS	AAPFFSGKPT	70
Clona 1	GSVTDVCGEH	KGYC IHMGHG	VYASVAHVVK	GDSFFLGERI	FDLKTNGEFC	CFRSTKILPS	AAPFFSGKPT	70
Clona 2	GSVTDVCGEH	KGYC IHMGHG	VYASVAHVVK	GDSFFLGERI	FDLKTNGEFC	CFRSTKILPS	AAPFFSGKPT	70
Clona 3	GSVTDVCGEH	KGYC IHMGHG	VYASVAHVVK	GDSFFLGERI	FDLKTNGEFC	CFRSTKILPS	AAPFFSGKPT	70
Clona 4	GSVTDVCGEH	KGYC IHMGHG	VYASVAHVVK	GDSFFLGERI	FDLKTNGEFC	CFRSTKILPS	AAPFFSGKPT	70
NS6/7	RDPWGS PVAT	EWKPKMYTTT	SGKILGCFAT	TSTETHPGDC	GLPYIDDNGR	VTGLHTGSGG	PKTPSAKLVV	140
Clona 1	RDPWGS PVAT	EWKPKMYTTT	SGKILGCFAT	TSTETHPGDC	GLPYIDDNGR	VTGLHTGSGG	PKTPSAKLVV	140
Clona 2	RDPWGS PVAT	EWKPKMYTTT	SGKILGCFAT	TSTETHPGDC	GLPYIDDNGR	VTGLHTGSGG	PKTPSAKLVV	140
Clona 3	RDPWGS PVAT	EWKPKMYTTT	SGKILGCFAT	TSTETHPGDC	GLPYIDDNGR	VTGLHTGSGG	PKTPSAKLVV	140
Clona 4	RDPWGS PVAT	EWKPKMYTTT	SGKILGCFAT	TSTETHPGDC	GLPYIDDNGR	VTGLHTGSGG	PKTPSAKLVV	140
NS6/7	PYVHIDMKTK	SVTAQKYDVT	KPDISYKGLI	CKQLDEIRII	PKGTRLHVSP	AHTEDYQEC	HQPASLGSGD	210
Clona 1	PYVHIDMKTK	SVTAQKYDVT	KPDISYKGLI	CKQLDEIRII	PKGTRLHVSP	AHTEDYQEC	HQPASLGSGD	210
Clona 2	PYVHIDMKTK	SVTAQKYDVT	KPDISYKGLI	CKQLDEIRII	PKGTRLHVSP	AHTEDYQEC	HQPASLGSGD	210
Clona 3	PYVHIDMKTK	SVTAQKYDVT	KPDISYKGLI	CKQLDEIRII	PKGTRLHVSP	AHTEDYQEC	HQPASLGSGD	210
Clona 4	PYVHIDMKTK	SVTAQKYDVT	KPDISYKGLI	CKQLDEIRII	PKGTRLHVSP	AHTEDYQEC	HQPASLGSGD	210
NS6/7	PRCPKSLTAI	VVDSLKPYCE	NVEGPPHDVL	HRVQKMLIDH	LSGFVPMNIS	SETSMLSFAH	KLNHDTSCGP	280
Clona 1	PRCPKSLTAI	VVDSLKPYCE	NVEGPPHDVL	HRVQKMLIDH	LSGFVPMNIS	SETSMLSFAH	KLNHDTSCGP	280
Clona 2	PRCPKSLTAI	VVDSLKPYCE	NVEGPPHDVL	HRVQKMLIDH	LSGFVPMNIS	SETSMLSFAH	KLNHDTSCGP	280
Clona 3	PRCPKSLTAI	VVDSLKPYCE	NVEGPPHDVL	HRVQKMLIDH	LSGFVPMNIS	SETSMLSFAH	KLNHDTSCGP	280
Clona 4	PRCPKSLTAI	VVDSLKPYCE	NVEGPPHDVL	HRVQKMLIDH	LSGFVPMNIS	SETSMLSFAH	KLNHDTSCGP	280
NS6/7	YLGGRKKDHM	ANGEPDKQLL	DLLSAKWKLA	TQGIALPHEY	TIGLKDELRP	VEKVSEGRKR	MIWGCDVGVA	350
Clona 1	YLGGRKKDHM	ANGEPDKQLL	DLLSAKWKLA	TQGIALPHEY	TIGLKDELRP	VEKVSEGRKR	MIWGCDVGVA	350
Clona 2	YLGGRKKDHM	ANGEPDKQLL	DLLSAKWKLA	TQGIALPHEY	TIGLKDELRP	VEKVSEGRKR	MIWGCDVGVA	350
Clona 3	YLGGRKKDHM	ANGEPDKQLL	DLLSAKWKLA	TQGIALPHEY	TIGLKDELRP	VEKVSEGRKR	MIWGCDVGVA	350
Clona 4	YLGGRKKDHM	ANGEPDKQLL	DLLSAKWKLA	TQGIALPHEY	TIGLKDELRP	VEKVSEGRKR	MIWGCDVGVA	350
NS6/7	TVCAAAFQGV	SDAITANHQY	GPIQVGINMD	SPSVEALFQR	IKSAAKVFAV	DYSKWDSTQS	PRVSAASIDI	420
Clona 1	TVCAAAFQGV	SDAITANHQY	GPIQVGINMD	SPSVEALFQR	IKSAAKVFAV	DYSKWDSTQS	PRVSAASIDI	420
Clona 2	TVCAAAFQGV	SDAITANHQY	GPIQVGINMD	SPSVEALFQR	IKSAAKVFAV	DYSKWDSTQS	PRVSAASIDI	420
Clona 3	TVCAAAFQGV	SDAITANHQY	GPIQVGINMD	SPSVEALFQR	IKSAAKVFAV	DYSKWDSTQS	PRVSAASIDI	420
Clona 4	TVCAAAFQGV	SDAITANHQY	GPIQVGINMD	SPSVEALFQR	IKSAAKVFAV	DYSKWDSTQS	PRVSAASIDI	420
NS6/7	LRYFSDRSPI	VDSASNTLKS	PPVAIFNGVA	VKVSSGLPSG	MPLTSVINSL	NHCLYVGCAI	LQSLEAKAIP	490
Clona 1	LRYFSDRSPI	VDSASNTLKS	PPVAIFNGVA	VKVSSGLPSG	MPLTSVINSL	NHCLYVGCAI	LQSLEAKAIP	490
Clona 2	LRYFSDRSPI	VDSASNTLKS	PPVAIFNGVA	VKVSSGLPSG	MPLTSVINSL	NHCLYVGCAI	LQSLEAKAIP	490
Clona 3	LRYFSDRSPI	VDSASNTLKS	PPVAIFNGVA	VKVSSGLPSG	MPLTSVINSL	NHCLYVGCAI	LQSLEAKAIP	490
Clona 4	LRYFSDRSPI	VDSASNTLKS	PPVAIFNGVA	VKVSSGLPSG	MPLTSVINSL	NHCLYVGCAI	LQSLEAKAIP	490
NS6/7	VTWNLFSTFD	IMTYGDDGVY	MFPIMYASIS	DQIFGNLSSY	GLKPTRVDKS	VGAIEPIDPD	SVVFLKRTIT	560
Clona 1	VTWNLFSTFD	IMTYGDDGVY	MFPIMYASIS	DQIFGNLSSY	GLKPTRVDKS	VGAIEPIDPD	SVVFLKRTIT	560
Clona 2	VTWNLFSTFD	IMTYGDDGVY	MFPIMYASIS	DQIFGNLSSY	GLKPTRVDKS	VGAIEPIDPD	SVVFLKRTIT	560
Clona 3	VTWNLFSTFD	IMTYGDDGVY	MFPIMYASIS	DQIFGNLSSY	GLKPTRVDKS	VGAIEPIDPD	SVVFLKRTIT	560
Clona 4	VTWNLFSTFD	IMTYGDDGVY	MFPIMYASIS	DQIFGNLSSY	GLKPTRVDKS	VGAIEPIDPD	SVVFLKRTIT	560
NS6/7	RTPQGRGLL	DRSSIIRQFY	YIKGENSDDW	KSPPKHIDPT	SRGQQLWNAC	LYASQHGLEF	FNKVYRLAER	630
Clona 1	RTPQGRGLL	DRSSIIRQFY	YIKGENSDDW	KSPPKHIDPT	SRGQQLWNAC	LYASQHGLEF	FNKVYRLAER	630
Clona 2	RTPQGRGLL	DRSSIIRQFY	YIKGENSDDW	KSPPKHIDPT	SRGQQLWNAC	LYASQHGLEF	FNKVYRLAER	630
Clona 3	RTPQGRGLL	DRSSIIRQFY	YIKGENSDDW	KSPPKHIDPT	SRGQQLWNAC	LYASQHGLEF	FNKVYRLAER	630
Clona 4	RTPQGRGLL	DRSSIIRQFY	YIKGENSDDW	KSPPKHIDPT	SRGQQLWNAC	LYASQHGLEF	FNKVYRLAER	630
NS6/7	AVEYEELHFE	PPTYASALDH	YNSQFNQVEA	RSDQIDSS			668	
Clona 1	AVEYEELHFE	PPTYASALDH	YNSQFNQVEA	RSDQIDSS			668	
Clona 2	AVEYEELHFE	PPTYASALDH	YNSQFNQVEA	RSDQIDSS			668	
Clona 3	AVEYEELHFE	PPTYASALDH	YNSQFNQVEA	RSDQIDSS			668	
Clona 4	AVEYEELHFE	PPTYASALDH	YNSQFNQVEA	RSDQIDSS			668	

Figura A6. Secuencias de la proteína NS6/7. Se muestran las secuencias de proteínas obtenidas a partir de la secuenciación de las clonas 1 y 4. Al lado izquierdo de las secuencias de las proteínas, se especifica la primer secuencia que corresponde a la obtenida en el Genbank con el número de acceso M86379, las siguientes secuencias, son las clonas 1 a 4. A la derecha, se indica el número total de aminoácidos de las secuencias obtenidas. El número de aminoácido se especifica con la barra vertical superior en el alineamiento.

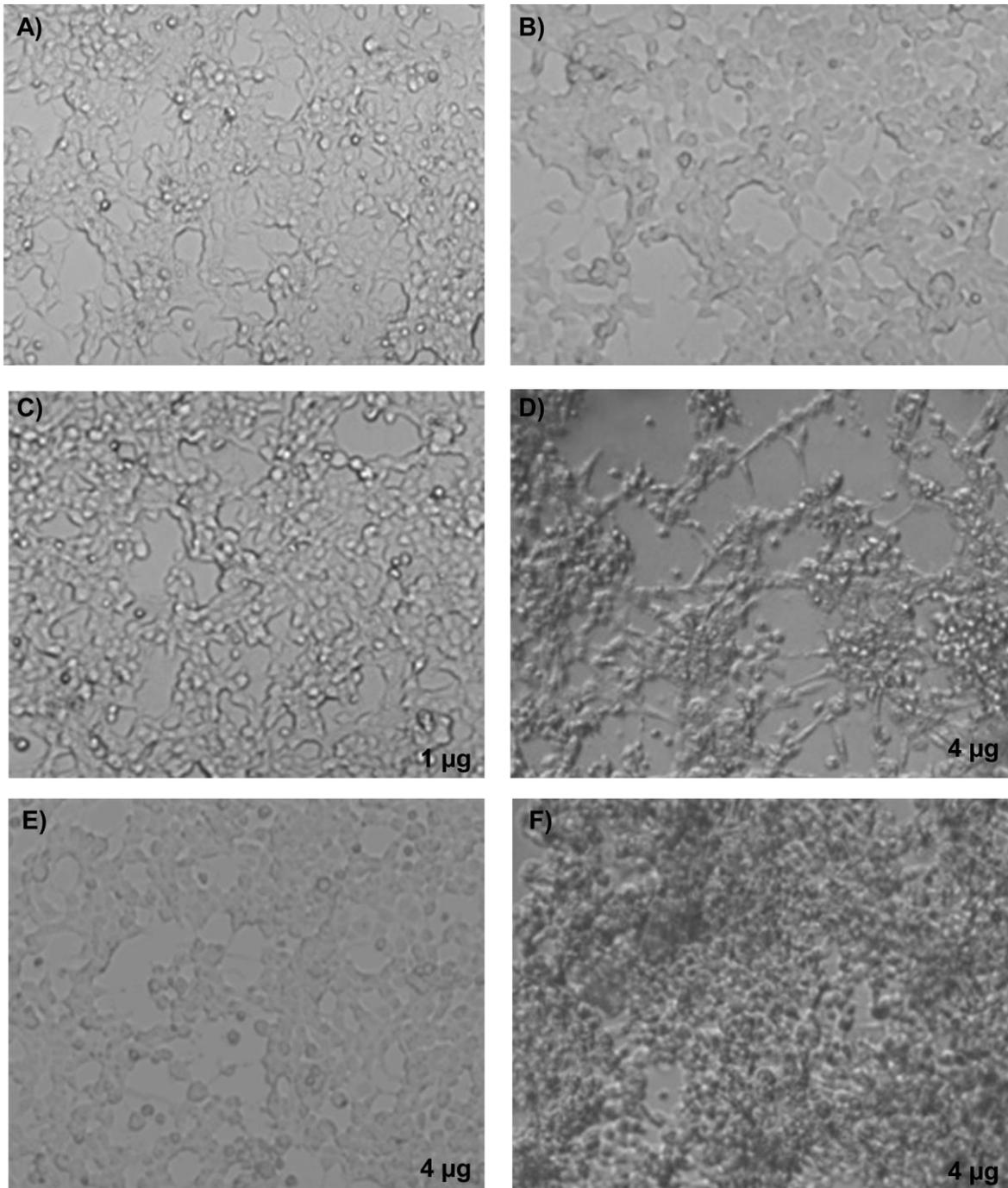


Figura A7. Desprendimiento de la monocapa de las células HEK293T transfectadas. Se muestra un aumento del campo claro de las células HEK293T sin transfectar (A), transfectadas con liposomas vacíos (B) y liposomas con pDsRed2-N1 a las 24 y 48 h (C y D) con 1 y 4 µg de DNA plasmídico respectivamente. En E) y F) se observan las células transfectadas con 4 µg del vector pDsRed2-N1-NS6/7 a las 24 y 48h respectivamente.

18. BIBLIOGRAFÍA

Abente E J, Sosnovtsev SV, Sandoval-Jaime C, Parra GI, Bok K, Green KY. 2013. The feline calicivirus leader of the capsid protein is associated with cytopathic effect. *Journal of virology*. 87: 3003-3017.

Al-Molawi N, Beardmore VA, Carter MJ, Kass GE, Roberts LO. 2003. Caspase-mediated cleavage of the feline calicivirus capsid protein. *J Gen Virol*. 84: 1237-1244.

Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. 2014. Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression. *Crit. Rev. Immunol*. 34: 301-314.

Ashkenazi A, Dixit V. 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol*. 11: 255-260.

Bailey D, Kaiser WJ, Hollinshead M, Moffatt K, Chaudhry Y, Wileman T, Sosnovtsev SV and Goodfellow IG. 2010. The feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localise to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation. *J Gen Virol*. 91: 739-49.

Benedict CA, Butrovich KD, Lurain NS, Corbell J, Rooney I, Schneider P, Tschopp J, Ware CF. 1999. Cutting edge: a novel viral TNF receptor super- family member in virulent strains of human cytomegalovirus. *J. Immunol*. 126: 6967-6970.

Bok K, Green KY. 2012. *Norovirus* gastroenteritis in immunocompromised patients. *NEngl J Med*. 367: 2126–2132

Bok K, Prikhodko VG, Green KY, Sosnovtsev SV. 2009. Apoptosis in murine *Norovirus*-infected RAW264.7 cells is associated with downregulation of survivin. *Journal of virology*. 83: 3647-3656.

Carter MJ, Milton ID, Meanger J, Bennett M, Gaskell RM, Turner PC. 1992. The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus. *Virology*. 190: 443-448.

Carter MJ, Milton ID, Turner PC, Meanger J, Bennett M, Gaskell RM, Turner PC. 1991. Caliciviruses. *Reviews in Medical Virology*. 1: 177-186.

Carter MJ. 1989. Feline calicivirus protein synthesis investigated by western blotting. *Arch Virol*. 108: 69-79.

Castanier C, Arnoult D. 2011. Mitochondrial localization of viral proteins as a means to subvert host defense. *Biochim Biophys Acta*. 4:575-83.

Clarke IN, Lambden PR. 1997. The molecular biology of caliciviruses. *J.Gen. Viral*. 78: 291-301

Clarke IN, Lambden PR. 2000. Organization and expression of calicivirus genes. *The Journal of Infectious Diseases*. 181: S309-S316.

Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JWB, Hardy ME. 2003. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J*. 22: 2852-2859.

Furman LM, Maaty WS, Petersen LK, Ettayebi K, Hardy ME, Bothner B. 2009. Cysteine protease activation and apoptosis in Murine *Norovirus* infection. *Virology*. 6: 139.

Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, Laliberte JF, Roberts L. 2005. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Rep*. 6: 968-972.

Green KY, Belliot G, Taylor JL, Valdesuso J, Lew JF, Kapikian AZ, Lin FY. 2002. A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly. *J Infect Dis*. 185:133-46.

Hall AJ, Lopman BA, Payne DC, Paterl MM, Gastañaduy PA, Vinjé J, Parashar UD. 2013. *Norovirus* disease in the United States. *Emerg Infect Dis*. 19: 1998-1205.

Herbert TP, Brierley I, Brown TD. 1996. Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *J. Gen. Virol.* 77:123–127.

Herbert TP, Brierley I, Brown TD. 1997. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol.* 78: 1033-1040.

Herod MR, Salim O, Skilton RJ, Prince C., Ward V K, Lambden PR, Clarke IN. 2014. Expression of the murine *Norovirus* (MNV) ORF1 polyprotein is sufficient to induce apoptosis in a virus-free cell model. *PLoS ONE.* 9: 3-11.

Jacotot E, Ravagnan L, Loeffler M, Ferri KF, Vieira HL, Zamzami N, Costantini P, Druillennec S, Hoebeke J, Briand JP, Irinopoulou T, Daugas E, Susin SA, Cointe D, Xie ZH, Reed JC, Roques BP, Kroemer G. 2000. The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J. Exp. Med.* 191: 33-46.

Kreutz LC, Seal BS. 1995. The pathway of feline calicivirus entry. *Virus Res.* 35: 63-70.

Kuyumcu-Martinez M, Belliot G, Sosnovtsev SV, Chang KO, Green KY, Lloyd RE. 2004. Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *J. Virol.* 78: 8172-8182.

Luttermann C, Meyers G. 2007. A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA. *J. Biol. Chem.* 282:7056-7065.

Makino A, Shimojima M, Miyazawa T, Kato K, Tohya Y, Akashi H. 2006. Junctional adhesion molecule I is a functional receptor for feline calicivirus. *J. Viral.* 80: 4482-4490.

Matsuura Y, Tohya Y, Onuma M, Roerink F, Mochizuki M, Sugimura T. 2000. Expression and processing of the canine calicivirus capsid precursor. *J. Gen. Virol.* 81: 195-199.

Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135-145.

Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ, Thumfart JO. 2000. Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* 276: 349-363.

Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ. 1991. Rabbit hemorrhagic disease virus: molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology.* 184: 664-676

Miller WA, Koev G. 2000. Synthesis of subgenomic RNAs by positive- strand RNA viruses. *Virology.* 273: 1-8.

Natoni A, Kass GEN, Carter MJ, Roberts LO. 2006. The mitochondrial pathway of apoptosis is triggered during feline calicivirus infection. *J. Gen. Virol.* 87: 357-361.

Neill JD, Mengeling WL. 1988. Further characterization of the virus specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Res.* 11:59–72.

Neill JD, Reardon IM, Heinrikson RL. 1991. Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calici- virus. *J Virol.* 65: 5440–5447.

Neill JD. 1990. Nucleotide sequence of a region of the feline calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA-polymerase, cysteine protease and 2C polypeptides. *Nucleic Acids Res.* 17:145-160.

Neill JD. 2002. The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res.* 87: 89-93.

Neumann S, El Maadidi S, Faletti L, Haun F, Labib S, Schejtman A, Maurer U, Borner C. 2015. How do viruses control mitochondria-mediated apoptosis?. *Virus Research.*

Neumann S, El Maadidi S, Faletti L, Haun F, Labib S, Schejtman A, Maurer U, Borner C. 2015. How do viruses control mitochondria-mediated apoptosis? *Virus Research.* 209: 45-55.

Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, Miyashita K, Takagi H, Tohya Y, Sato H, Takeda N. 2007. Highly conserved Configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *The Journal of Virology*. 81: 6798-6806.

Piguet V, Schwartz O, Le Gall S, Trono D. 1999. The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunol. Rev.* 168: 51-63.

Seal BS, Ridpath JF, Mengeling W. L. 1993. Analysis of feline calicivirus capsid protein genes: identification of variable anti- genic determinant regions of the protein. *J Gen Virol* 74, 2519–2524.

Smith CA, Davis T, Wignall JM, Din WS, Farrah T, Upton C, McFadden G, Goodwin RG. 1991. T2 open reading frame from the Shope fibroma virus encodes a soluble form on the TNF receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 335-342.

Sosnovtsev S V, Green K Y. 2000. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology*. 277:193–203

Sosnovtsev S, Green KY. 1995. RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity. *Virology* 210:383–390.

Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY. 2002. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J Virol.* 76: 7060-7072.

Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY. 2002. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J. Virol.* 76: 7060-7072.

Sosnovtsev SV, Prikhod'ko E , Belliot G, Cohen JI, Green K Y. 2003. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Research.* 94: 1-10.

Sosnovtsev SV, Sosnovtseva S A, Green K Y. 1998. Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J. Virol.* 72:3051–3059.

Sosnovtseva SA, Sosnovtsev SV, Green KY. 1999. Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J Virol.* 73: 6626-6633.

Stewart SA, Poon B, Jowett JB, Xie Y, Chen IS. 1999. Lentiviral delivery of HIV-1 Vpr protein induces apoptosis in transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 12039-12043.

Strasser A, Jost PJ, Nagata S. 2009. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity.* 30: 180-192.

Tohya Y, Masuoka K, Takahashi E, Mikami T. 1991. Neutralizing epitopes of feline calicivirus. *Arch. Virol.* 117: 173–181

Tohya Y, Shinchu H, Matsuura Y, Maeda K, Ishiguro S, Mochizuki M, Sugimura T. 1999. Analysis of the N-terminal polypeptide of the capsid precursor protein and the ORF3 product of feline calicivirus. *J Vet. Med. Sci.* 61: 1043-1047.

Vashist S, Bailey D, Putics A, Goodfellow I, 2009. Model systems for the study of human *Norovirus* biology. *Future Virol.* 4: 353-367

Vaux DL, Strasser A. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 93: 2239-2244.

Wei L, Huhn JS, Mory A, Pathak HB, Sosnovtsev SV, Green KY, Cameron CE. 2001. Proteinase-polymerase precursor as the active form of feline calicivirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol.* 75: 1211-1219.

Yunus MA, Chung LM, Chaudhry Y, Bailey D, Goodfellow I. 2010. Development of an optimized RNA-based murine *Norovirus* reverse genetics system. *J. Virol. Methods* 169:112–118.

Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. 1972. Visualization by immune electron micro scopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 10:1075-1081.

Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinje J, Parashar UD. 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1224-1231.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major patho- gens. *Emerging Infectious Diseases*, 17: 7-15.

Paniagua GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E, Vaca S. 2007. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children”. *Annals Clin Microbiol and Antimicrobials* 6: 1-8.

Hernández-Cortez C, Aguilera-Arreola M, Castro-Escarpulli G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol.* 31: 137-151.

Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MPG, Estes MK. 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol.* 85: 79-87.

Gaskell RM. 1985. Viral-induced upper respiratory tract diseases. In: Chandler, E.A., Gaskell, C.J., Hilbery, A.D.R. (Eds.). *Feline Medicine and Therapeutics*. Blackwell Scientific Publications Oxford. 257-270.

Pesavento PA, Chang KO, Parker JS. 2008. Molecular virology of feline calicivirus. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 38: 775-786.

Ettayebi K, Hardy ME. 2003. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J. Virol.* 77: 11790-11797.

Kaiser WJ, Chaudhry Y, Sosnovtsev SV, Goodfellow IG. 2006. Analysis of protein–protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *J. Gen. Virol.* 87: 363-368.

Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. 1989. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17:4713-30.

Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, Laliberte JF, Roberts L. 2005. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep.* 6: 968-972.

Cancio-Lonches C, Yocupicio-Monroy M, Sandoval-Jaime C, Galvan-Mendoza I, Ureña L, Vashist S, Goodfellow I, Salas-Benito J, Gutiérrez-Escolano AL. 2011. Nucleolin interacts with the feline calicivirus untranslated region and the protease-polymerase NS6 and NS7 proteins, playing a role in virus replication. *J. Virol.* 85: 8056-8068.

Miller WA, G Koev. 2000. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology.* 273:1-8.

Roy A, Kucukural A, Zhang Y. 2010. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5: 725-738.

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28: 235-242.

Vickery JR , Vickery LE. 2000. Crystal structure of Hsc20, a J-type Co-chaperone from *Escherichia coli*. *J Mol Biol .* 5:835-45.

Jeffrey J.D, Oduyebo T. 2006. Poliovirus protein 3AB displays nucleic acid chaperone and helix-destabilizing activities. *J Virol.* 80:1662-71.

Yang J, Xia H, Qia Q, Zhou X. 2015. RNA chaperones encoded by RNA viruses. *Virologica Sinica.* 30: 401-409.

Wang N, Chelliah Y, Shan Y, Taylor CA, Yoo S. 2013. Crystal structure of the heterodimeric CLOCK:BMAL1 transcriptional activator complex. *Science.* 337: 189-194.

Jin MS, Oldham ML, Zhang Q, Chen J. 2012. Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 90:566-9.

Davies JM, Brunger AT, Weis WI. 2008. Improved structures of full-length p97, an AAA ATPase: implications for mechanisms of nucleotide-dependent conformational change. *Structure*. 16:715-2.

Goldstaub D, Gradi A, Bercovitch Z, Grosman Z, Nophar Y, Luria S, Sonenberg N, Kahana C. 2000. Poliovirus 2A protease induces apoptotic cell death. *Mol. Cell. Biol.* 20: 1271-1277.

Kimelman A, Levy A, Sberro H, Kidron S, Leavitt A, Amitai G, YoderHimes DR, Wurtzel O, Zhu Y, Rubin EM, and Sorek R. 2012. A vast collection of microbial genes that are toxic to bacteria. *Genome Res.* 22: 802–809.