

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Facultad de Ciencias

**Análisis de la estructura primaria y
estudios sobre la expresión y
procesamiento de la región no estructural
del genoma de astrovirus humano (Yuc-8)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Biol. PEDRO ROMERO GUIDO

DIRECTOR DE TESIS: **Dr. ERNESTO MÉNDEZ SALINAS**

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2005



COORDINACIÓN

m. 349205



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: PEDRO ROMERO GUIDO
FECHA: 14 SEPTIEMBRE 2005
FIRMA:

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 06 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Romero Guido Pedro** con número de cuenta 99809944 y número de expediente 3991120 con la tesis titulada: "**Análisis de la estructura primaria y estudios sobre la expresión y procesamiento de la región no estructural del genoma de astrovirus humano (Yuc-8).**", bajo la dirección del(a) Dr. Ernesto Méndez Salinas

Presidente:	Dr. Antonio Eusebio Lazcano-Araujo Reyes
Vocal:	Dr. Luis Padilla Noriega
Secretario:	Dr. Ernesto Méndez Salinas
Suplente:	Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama
Suplente:	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 22 de agosto del 2005

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de virus causantes de gastroenteritis que es dirigido por los Doctores Carlos F. Arias y la Dra. Susana López, del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología, UNAM.

El Comité Tutorial que evaluó este trabajo estuvo integrado por:

Dra. Clara Inés Espitia Pinzón (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

Dr. Antonio Eusebio Lazcano-Araujo Reyes (Facultad de Ciencias, UNAM)

Dr. Ernesto Méndez Salinas (Instituto de Biotecnología, UNAM)

Este trabajo fue parcialmente apoyado por DGAPA-UNAM proyecto IN200999 y CONACyT proyecto MENSE31739.

AGRADECIMIENTOS

A todos los que participaron de alguna manera en la realización de este trabajo y a los que me permitieron aprender lo interesante de la ciencia, en especial a:

Dr. Carlos F. Arias
Dra. Susana López
Dr. Ernesto Méndez Salinas
Dr. Pavel Isa
Dra. Martha Méndez Toss
M.C. María Elena Munguía
Dr. Carlos Arturo Guerrero
Dr. Antonio E. Lazcano-Araujo Reyes
Dra. Clara I. Espitia Pinzón
Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama
Dr. Luis Padilla Noriega

Con gran respeto y admiración a Pedro Romero González, quien además de ser mi Padre y ejemplo a seguir, siempre estuvo pendiente de este trabajo, compartimos mesa, reactivos y material, además de su invaluable asesoría en todos los aspectos teóricos y técnicos del laboratorio.

A Lilia Espinosa Sánchez, jefa de oficina del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por todo el apoyo administrativo que me brindó desde que ingresé al posgrado.

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres, Pedro Romero González y Rosa María Guido Rodríguez...

Ustedes hicieron muy bien su papel como padres para enseñarme que la preparación profesional es fundamental en nuestras vidas, siempre estuvieron dispuestos a apoyarme moral y económicamente, tuvieron que soportar este largo e incierto proceso que desesperadamente rompía esperanzas, pero ustedes trazaron firmemente el camino, me hicieron reencontrarlo y seguirlo hasta culminar. Ahora puedo decir que se aprende de las experiencias, que no hay buenas ni malas, que el tiempo sigue, pero nos enseña más.

En este momento, cuando lean estas líneas, sabrán que este ciclo ha concluido y que ustedes están presentes en cada una de las palabras que contiene esta tesis.

Gracias por ser mis padres, por hacerme saber que cuento con ustedes, por confiar en mí y por todas las cosas que hemos compartido en estos treinta años...

Sinceramente, los amo...

A Natalia y Julieta, quienes con amor y paciencia han compartido este proyecto, brindaron apoyo e hicieron sacrificios sólo con el afán de seguir adelante, de superarnos y demostrar que todo se puede cuando estamos unidos. Gracias por ser mi familia, gracias por amarme...

Dedicada con todo mi amor...

A mis hermanos, Saúl, Cynthia, Gabriela y sus respectivas familias, de quienes su apoyo incondicional siempre estuvo presente.

Un fuerte abrazo...

A la familia García Flores, quienes también se vieron involucrados en la realización de esta tesis y siempre ofrecieron su ayuda...

Mis más sinceros agradecimientos...

A ti, por permitirte leer esta tesis...

Gracias a Todos.

ÍNDICE

Abreviaturas y unidades	1
Resumen	3
1.1.- Aspectos generales	4
1.1.1.- Gastroenteritis viral	4
1.1.2.- Astrovirus: Perspectiva histórica	5
1.2.- Características biológicas de los astrovirus	6
1.2.1.- Hospederos naturales	6
1.2.2.- Morfología y estructura	7
1.2.3.- Taxonomía y clasificación	8
1.2.4.- Propagación <i>in vitro</i> en cultivos celulares	10
1.2.5.- Replicación, transcripción y traducción del genoma	10
1.2.6.- Organización genómica	12
1.2.6.1.- Poliproteína no estructural del ORF1a	14
1.2.6.2.- Poliproteína no estructural del ORF1b	15
1.2.6.3.- Poliproteína estructural del ORF2	16
1.2.7.- Procesamiento proteolítico de las poliproteínas	16
1.2.7.1.- Proteínas no estructurales	16
1.2.7.2.- Proteínas estructurales	18
1.2.8.- Características físico-químicas	21
1.3.- Aspectos clínicos de las infecciones por astrovirus	22
1.3.1.- Transmisión, patogénesis y sintomatología	22
1.3.2.- Epidemiología	24
1.3.3.- Inmunidad	27
1.3.4.- Tratamiento y control de la enfermedad	28
2.1.- Antecedentes	29
3.1.- Objetivos	30
4.1.- Materiales y Métodos	31
4.1.1.- Extracción de RNA de astrovirus a partir de heces o células infectadas	31
4.1.2.- Transcripción reversa (RT)	32
4.1.3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
4.1.4.- Oligonucleótidos utilizados para clonar y secuenciar el RNA de la cepa Yuc-8	33
4.1.5.- Purificación de fragmentos de DNA	34
4.1.6.- Secuenciación de fragmentos de DNA	35
4.1.7.- Enzimas de restricción y modificación	35
4.1.8.- Preparación de células E. coli electrocompetentes	35
4.1.9.- Transformación de E. coli por electroporación	36
4.1.10.- Purificación de plásmidos (minipreps)	36
4.1.11.- Análisis del tamaño de plásmidos por lisis directa de bacterias	37
4.1.12.- Inducción de proteínas expresadas en bacteria	38
4.1.13.- Geles de poliacrilamida-SDS	38
4.1.14.- Electroelución de proteínas	39
4.1.15.- Preparación de muestra para inmunización	39

4.1.16.- Western Blot	40
4.1.17.- Cultivo de células	41
4.1.18.- Infección de células con astrovirus humano Yuc-8	41
4.1.19.- Ensayo de expresión transitoria	42
4.1.20.-Inmunofluorescencia	44
4.1.21.- Vectores de clonación y expresión	45
4.1.22.- Programas para análisis de secuencia	46
4.1.23.- Soluciones	46
5.1.- Resultados	49
5.1.1.- Obtención de la secuencia genómica de Yuc-8	49
5.1.2.- Construcciones en el plasmido pRS2	51
5.1.3.- Organización genómica de Yuc-8	51
5.1.4.- Comparación de Yuc-8 con otros serotipos de astrovirus de humano	54
5.1.5.- Predicción de estructura y modificaciones postraduccionales en las poliproteínas de Yuc-8	59
5.1.6.- Obtención de proteínas de fusión y sueros hiperinmunes	61
5.1.7.- Reactividad de sueros hiperinmunes contra proteínas de Yuc-8	65
6.1.- Discusión	70
7.1.- Conclusiones	76
8.1.- Bibliografía	77
9.1.- Artículo Anexo	86

ABREVIATURAS Y UNIDADES

A continuación se listan las abreviaturas y unidades más utilizadas en este trabajo. Para las abreviaturas, en algunos casos se indica sólo su significado en inglés y en otros casos su significado en inglés y su traducción al español.

°C	Grados Celsius
aa	Aminoácido
Acc.	Nº Accession Number (número de acceso en el GenBank)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
RNA	Ácido ribonucleico
CaCo-2	Carcinoma de colon -2 (línea celular eucariota de origen humano)
col.	Colaboradores
dNTP	Desoxiribonucleotide triphosphate (desoxirribonucleótido trifosfato)
EDTA	Ethilen-diamine-tetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (ensayo inmunoenzimático)
hr	Hora
HAsTV	Human astrovirus (astrovirus humano)
HVR	Hipervariable region (región hipervariable)
ICTV	International Comitee for Taxonomy of Viruses
IF	Inmunofluorescencia
IP	Inmunoprecipitación
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyraniside
IRE	Immunoreactive epitope (epítipo inmunoreactivo)
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
kb	Kilo bases
kD	Kilo Daltones
LB	Luria broth (medio luria)
lt	Litro
MEM	Minimal essential medium (medio mínimo esencial)
μ g	Microgramo
μ l	Microlitro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
ng	Nanogramo
NLS	Nuclear localization signal (señal de localización nuclear)
nsP	Non structural protein (proteína no estructural)
ORF	Open reading frame (marco abierto de lectura)
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida)
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline (tampón fosfato salino)
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
POL	Polimerasa
PRO	Proteasa
RFS	Ribosomal frameshifting

RNT	Región no traducida
RT	Reverse transcriptase (transcripción reversa)
SDS	Sodio-dodecil-sulfato
seg	Segundo
SFB	Suero fetal bovino
TM	Transmembrane helices (dominio transmembrana)
UTR	Untranslate region (región no traducida)
VP	Viral protein (proteína viral)
WB	Western blot

RESUMEN

Los astrovirus son reconocidos como el segundo agente infeccioso causantes de gastroenteritis viral en infantes y adultos de todo el mundo. En este trabajo iniciamos la caracterización de una cepa de astrovirus (Yuc-8) nativa de México que fue aislada, adaptada a cultivo celular y secuenciado completamente su genoma, siendo la primera secuencia completa de este serotipo reportada. Yuc-8 pertenece al serotipo 8 que ha sido aislado raramente en el mundo y se considera como un serotipo emergente. Conserva las características de organización genómica y los motivos que codifican para proteínas necesarias en la replicación de los astrovirus. La generación de proteínas recombinantes con secuencias codificantes de Yuc-8, permitieron la obtención de antisueros que fueron utilizados para estudiar el procesamiento de las proteínas virales expresadas de manera transitoria, así como su localización en células infectadas con Yuc-8, por inmunofluorescencia. Así de esta manera detectamos dos proteínas derivadas del extremo amino de la región no estructural, de aproximadamente 18 y 23 kD, y una proteína de 59 kD, que posiblemente represente el procesamiento de la RNA polimerasa dependiente de RNA. Por otro lado, se determinó que las proteínas virales se localizan en el citoplasma, en un área perinuclear, lo que parece confirmar que su replicación es citoplásmica y que la reactividad de los antisueros producidos es altamente específica. Finalmente, Yuc-8 lo hemos considerado como un modelo de estudio para entender la biología molecular de los astrovirus y la búsqueda de alternativas para la prevención de enfermedades gastrointestinales de tipo viral.

1.1.- Aspectos Generales

1.1.1.- Gastroenteritis Viral

Los principales agentes infecciosos causantes de la gastroenteritis vírica en humanos son los rotavirus, los adenovirus entéricos, los calicivirus y los astrovirus (Wilhelmi y col., 2003). De todos ellos, los que presentan una mayor relevancia médica en los países desarrollados son los rotavirus, debido a la elevada prevalencia de la enfermedad que ocasiona y al impacto económico que conlleva su atención (casi dos millones de casos tratados al año y más de 200,000 hospitalizaciones anuales). A nivel de los países en vías de desarrollo las cifras se multiplican por diez, y las gastroenteritis causadas por rotavirus se consideran como una de las primeras causas de mortalidad infantil debido a los problemas de deshidratación, ya que no se tratan a nivel hospitalario por falta de una infraestructura adecuada.

Los rotavirus son miembros de la familia *Reoviridae*, virus icosaédricos de unos 70 nm de diámetro y sin envoltura lipídica. La cápside está compuesta por tres capas proteicas dispuestas concéntricamente, y su genoma consta de 11 moléculas de RNA bicatenario.

Los adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae*. Se trata de virus icosaédricos de aproximadamente 70 nm de diámetro, sin envoltura lipídica, con un genoma de DNA bicatenario y con espículas características que sobresalen de su superficie. Los adenovirus entéricos tipo 40 y 41 son especialmente importantes como causantes de gastroenteritis en la población infantil.

Los calicivirus pertenecen a la familia *Caliciviridae*, en la que se agrupan los géneros *Norovirus* y *Sapovirus*. Son virus icosaédricos de aproximadamente 27-40 nm de diámetro, sin

envoltura lipídica y con una molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva como genoma. Fueron los primeros agentes víricos asociados a gastroenteritis (Kapikian y col., 1972) y se consideran la primera causa de brotes de gastroenteritis virales en adultos, aunque no se puede obviar su prevalencia en niños.

Los astrovirus, motivo de estudio del presente trabajo, serán descritos con mayor detalle a continuación.

1.1.2. Astrovirus: Perspectiva Histórica

Los astrovirus fueron identificados por primera vez como agentes infecciosos causantes de gastroenteritis en el año 1975 durante la investigación de un brote de diarrea y vómitos entre los niños de una sala de maternidad (Appleton y Higgins, 1975). La observación al microscopio electrónico de muestras de heces de niños enfermos, en busca del agente causal puso de manifiesto la presencia de partículas virales con morfología distinta a otros virus conocidos hasta ese momento que se asociaban con gastroenteritis, como los rotavirus o los calicivirus. El término astrovirus fue propuesto meses más tarde a su descubrimiento por Madeley y Cosgrove (1975). El nombre de astrovirus deriva de la palabra “astron”, que significa estrella en griego, y hace referencia a su característica estructura estrellada presente en la superficie de la cápside.

Un paso importante para un mejor conocimiento de los astrovirus lo dieron Lee y Kurtz en 1981, cuando consiguieron aislar y propagar con éxito una cepa de astrovirus humano en células HEK (células embrionarias de riñón humano). Este hecho permitió el aislamiento y posterior identificación de cinco serotipos de astrovirus en 1984 (Kurtz y Lee, 1984), y la

obtención de anticuerpos monoclonales que han sido utilizados ampliamente como método de diagnóstico por inmunoensayo (Herrmann y col, 1988; y Herrmann y col., 1990). Posteriormente se identificaron dos nuevos serotipos (serotipos 6 y 7, Lee y Kurtz, 1994).

A partir de la década de los 90 se confirmó la importancia clínica de los astrovirus como agentes causantes de gastroenteritis en niños, utilizando principalmente microscopía electrónica y ensayos inmunoenzimáticos como métodos de diagnóstico. A la fecha se han desarrollado múltiples técnicas para la detección del ácido nucleico de astrovirus, lo cual ha resultado en una mayor sensibilidad en el diagnóstico. La secuenciación completa del primer genoma de astrovirus se consiguió en 1993 (Jiang y col., 1993) y la construcción del primer clon de cDNA del genoma completo del astrovirus serotipo 1 se realizó en 1997 (Geigenmüller y col., 1997). En el 2000, Méndez-Toss y col. Reportaron la caracterización molecular de una cepa de astrovirus perteneciente a un serotipo considerado poco frecuente y que ha sido agrupado como un octavo serotipo (HAstV-8).

1.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LOS ASTROVIRUS

1.2.1. Hospederos Naturales

Aparte de tener como hospedero natural al hombre, los astrovirus también se han asociado etiológicamente a varias enfermedades en diversas especies de animales que incluyen tanto mamíferos como aves (Woode y Bridger, 1978; Snodgrass y col., 1979, Williams, 1980; Hoshino y col., 1981; Shimizu y col., 1990; Englund y col., 2002; y Jonassen y col., 2003). En la mayoría de las especies, las infecciones por astrovirus afectan al aparato gastrointestinal; sin embargo, también se han descrito otras enfermedades como la nefritis intersticial aguda, el

retraso del crecimiento en pollos (Imada y col., 1979), la hepatitis en patos (Gough y col., 1984) y la enfermedad denominada “*poult enteritis and mortality síndrome*” en pavos (Koci y col.; 2000). Todas estas enfermedades pueden llegar a causar grandes pérdidas económicas para la industria avícola.

Los astrovirus parecen tener una elevada especificidad de especie, ya que nunca se han descrito casos de transmisión interespecies, ni de reacción cruzada utilizando anticuerpos específicos entre cepas de astrovirus aisladas de diferentes especies animales (Tzipori y col., 1981; y Harbour y col., 1987). Sin embargo, estudios filogenéticos realizados con la secuencia de la proteína de la cápside sugieren la posibilidad de que pudieran generarse zoonosis por astrovirus (Jonassen y col., 2001). Actualmente se postula que la introducción de los astrovirus en la población humana fue debida a una única transmisión del virus proveniente de una única especie animal (Lukashow y Goudsmit, 2002).

1.2.2. Morfología y Estructura

Los astrovirus son virus pequeños, sin envoltura lipídica, de simetría icosaédrica y con un genoma compuesto por una cadena de RNA monocatenario de polaridad positiva. Su principal característica morfológica es su apariencia estrellada. Se considera que tienen un diámetro de 28 nm, aunque puede variar en función del origen del virus (heces o cultivo celular), del método de purificación y del modo de preparación de la muestra para su observación bajo el microscopio electrónico. Del mismo modo, su característica estructura estrellada sólo se observa en un 10% de los viriones presentes en una preparación. Estudios de ultraestructura del astrovirus serotipo 2 realizados por Risco y col. (1995) mostraron que los virus presentan unas

espículas protuberantes en la superficie, haciendo que el diámetro total del virión alcance los 41 nm, mientras que si no se consideran dichas espículas, el diámetro del virión es de unos 30 nm. Además, comprobaron que el tratamiento alcalino de la muestra induce la aparición de la morfología estrellada en los viriones. Posteriores estudios de crioelectromicroscopía demostraron que las partículas del astrovirus serotipo 1 constan de una cápside central de 33 nm de diámetro de la que se proyectan 30 espículas diméricas que se extienden 5 nm desde la superficie de la cápside dando un rango total de la partícula vírica de 38-43 nm (Matsui y Greenberg, 2001a) (Figura 1.1).

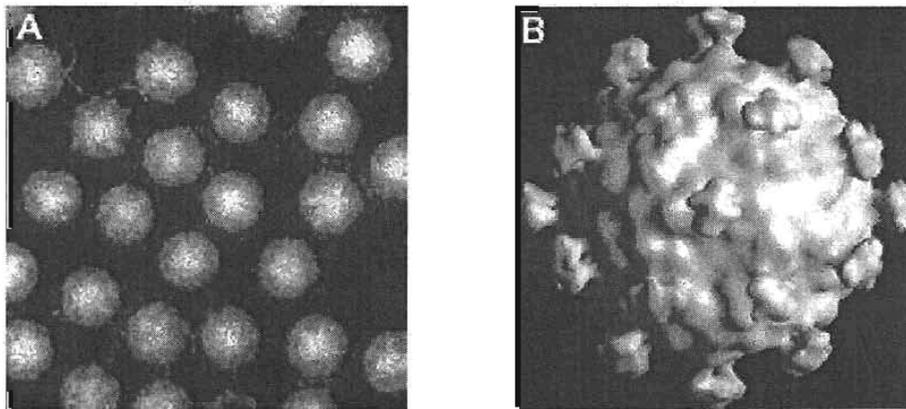


Figura 1.1: A: Inmuno-electromicroscopía de astrovirus. B: Reconstrucción tridimensional del astrovirus serotipo 1 (Yeager; Fields Virology, 4th edition, 2001).

1.2.3. Taxonomía y Clasificación

Los astrovirus pertenecen a la familia *Astroviridae*, dentro del *subphylum* de virus de RNA monocatenario de polaridad positiva (van Regenmortel y col., 2000). En base al análisis de las proteínas y ARNs sintetizados durante la infección de cultivos celulares con astrovirus se propuso incluirlos en una nueva familia a las descritas hasta ese momento. Posteriormente, en base a la secuencia del genoma completo de astrovirus, se identificaron ciertos motivos

llamados (*ribosomal frameshifting* (RFS) y el motivo de RNA polimerasa dependiente de RNA, así como la ausencia de un dominio de RNA helicasa) (Jiang y col., 1993; Monroe y col., 1993; y Lewis y col., 1994), que confirmaron su clasificación como una familia independiente, lo cual ha sido avalado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) en el año 1995.

Actualmente, la ICTV ha propuesto dos géneros: *Mamastrovirus* (astrovirus de mamíferos) y *Avastrovirus* (astrovirus de aves) dentro de la familia *Astroviridae*. Los HAstV pertenecen al género mamastrovirus y hasta la fecha se han descrito 8 serotipos, reconocidos tanto por su reactividad con sueros como por la secuencia de su proteína estructural. Las características principales de astrovirus humanos se detallan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1: Características principales de astrovirus humanos.

Estructura
<ul style="list-style-type: none">- Partículas icosaédricas de 38-43 nm de diámetro- Sin envoltura lipídica
Genoma
<ul style="list-style-type: none">- RNA monocatenario de polaridad positiva de 6.8 kb y poliadenilado.- Organización genómica en tres ORFs: ORF1a, ORF1b (proteínas no estructurales) y ORF2 (proteínas estructurales).- Presencia de una señal de RFS entre ORF1a y ORF1b.- Falta de dominio de helicasa.- Utilización de un RNA subgenómico de ~ 2.8 kb para la síntesis de las proteínas estructurales.<ul style="list-style-type: none">- El RNA transfectado en células CaCO2 y BHK-21 es capaz de generar partículas virales infecciosas.
Replicación
<ul style="list-style-type: none">- Replicación citoplásmica- Necesidad de utilizar tripsina para su propagación en cultivo celular

1.2.4. Propagación *In Vitro* en Cultivos Celulares

Dos años después del descubrimiento de los astrovirus, Lee y Kurtz (1977) demostraron por inmunofluorescencia que los astrovirus presentes en las heces de los enfermos eran capaces de infectar células primarias embrionarias de riñón de origen humano (línea celular HEK). Sin embargo no fue hasta 1981 que consiguieron propagar el virus en líneas celulares derivadas de primate (PBK y LLCMK2), tras múltiples pases a ciegas en la línea celular HEK y con la incorporación de tripsina en el medio de cultivo.

En 1990, Willcocks y col. adaptaron cepas de astrovirus aisladas directamente de heces a la línea celular intestinal de origen humano CaCo-2, siempre en presencia de tripsina. Hoy en día, las dos líneas celulares más utilizadas para el aislamiento de astrovirus a partir de muestras fecales de enfermos con gastroenteritis son las líneas de origen humano CaCo-2 y PLC/PRF/5 (Willcocks y col., 1990; Pintó y col., 1996; y Taylor y col., 1997). Del mismo modo, las líneas celulares más utilizadas para su propagación son CaCo-2, LLMCK2, T84 y HT-29.

1.2.5. Replicación, Transcripción y Traducción del Genoma

Los virus de RNA monocatenario de polaridad positiva representan la clase más grande de virus presentes en la naturaleza. El genoma de este tipo de virus contiene genes que codifican para proteínas no estructurales y proteínas estructurales. A pesar del rápido cambio mutacional, que es típico en este grupo de virus, las enzimas que intervienen en la replicación y transcripción de sus genomas contienen motivos conservados. Entre estas proteínas están la RNA polimerasa dependiente de RNA, RNA helicasa, proteasas de diversos tipos y

metiltransferasas, de las cuales la RNA polimerasa dependiente de RNA es la única universalmente conservada entre los virus de RNA de polaridad positiva. La RNA helicasa generalmente es codificada por virus de RNA con genomas mayores de 6 kb y su función es desenrollar estructuras de RNA de doble cadena rompiendo puentes de hidrógeno entre las dos cadenas. Los virus de RNA monocatenario de polaridad positiva expresan todas o parte de sus proteínas a partir de una poliproteína que es procesada proteolíticamente. Generalmente el procesamiento de las proteínas de la envoltura del virión está mediado por proteasas celulares, mientras que las proteínas no estructurales, y en algunos casos proteínas de la cápside, son procesadas por proteasas codificadas por el propio virus, las cuales pueden ser proteasas de cisteína ó serina. Los genes de esas proteínas forman módulos parcialmente conservados de un gran subgrupo de virus (S. Jane Flint y col 1999).

El esquema de replicación, transcripción y traducción propuesto para astrovirus deriva del bien caracterizado modelo de alphavirus. Los astrovirus presentan una organización genómica similar a la de alphavirus los cuales también sintetizan las proteínas estructurales a partir de un RNA subgenómico (Schlesinger y Schlesinger, 1996); sin embargo, los alphavirus, a diferencia de los astrovirus, son virus que contienen envoltura lipídica.

A grandes rasgos, tras la entrada del virus en la célula y la desencapsidación del genoma, tiene lugar la síntesis de las proteínas no estructurales a partir del genoma viral. Estas proteínas transcriben el genoma dando lugar a un RNA de polaridad negativa (RNA anti-genómico) que sirve de molde para la síntesis de nuevos genomas así como de moléculas de RNA subgenómico de polaridad positiva que son traducidas para dar lugar a las proteínas estructurales. El RNA subgenómico es de aproximadamente 2,500 nucleótidos y tiene las

siguientes características: (I) Una región no traducida en el extremo 5' de 11 nucleótidos; (II) un marco de lectura abierto de aproximadamente 2,300 nucleótidos; (III) una región no traducida de 85 nucleótidos en el extremo 3'; y (IV) una secuencia de poli A en el extremo 3' (Monroe y col., 1991).

Tras darse el ensamblaje del genoma, los viriones salen al exterior de la célula para infectar células vecinas.

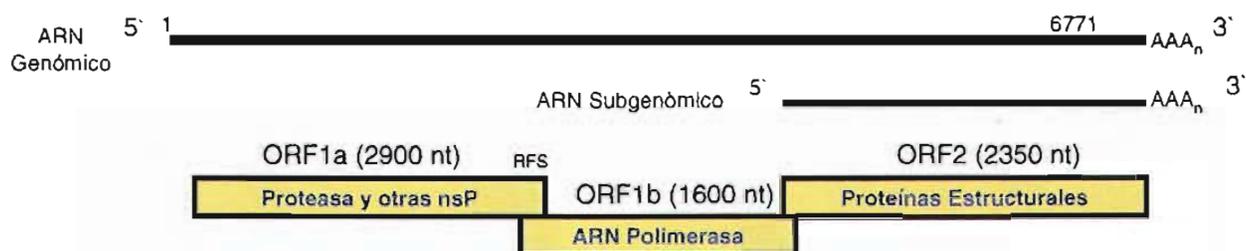
1.2.6. Organización Genómica

El genoma de astrovirus está compuesto por una molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva de aproximadamente 6.8 kb de longitud y poliadenilado en el extremo 3' (Matsui y Greenberg, 2001a). El RNA genómico viral es infeccioso, es decir es capaz de producir virus infecciosos cuando se introduce a células no susceptibles, como la línea celular BHK-21, ó a células susceptibles a la infección, como la línea celular CaCo-2 (Geigenmüller y col., 1997). Este RNA puede ser extraído de partículas virales u obtenerse por transcripción *in vitro* a partir del cDNA de un clon que contiene el genoma completo del virus, Durante el ciclo replicativo de astrovirus, además del RNA genómico, también se producen moléculas de RNA subgenómico de aproximadamente 2.8 kb, el cual se utiliza para la síntesis de las proteínas estructurales (Monroe y col., 1991).

El genoma de astrovirus se organiza en tres marcos de lectura abiertos denominados ORF1a, ORF1b y ORF2 por sus siglas en inglés "open reading frame" (Monroe y col., 1995). Los ORF1a y ORF1b codifican para las proteínas no estructurales del virus, y el ORF2 codifica

para las proteínas de la cápside a partir del RNA subgenómico mencionado previamente (Figura 1.2 (A)).

A



B

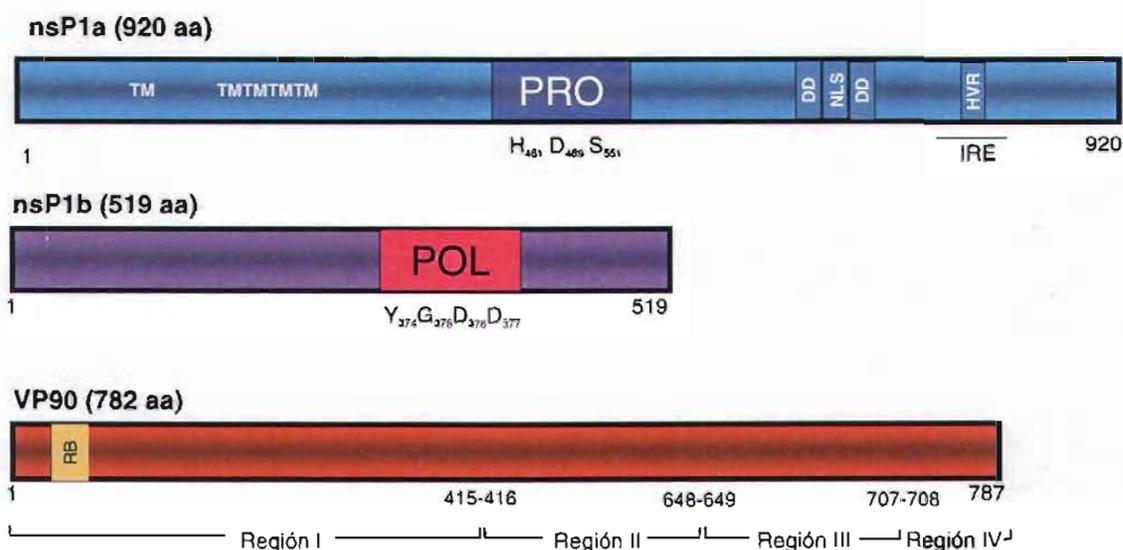


Figura 1.2: (A) Organización genómica del HastV-1 (Acc. No. L23513); donde RFS: señal de ribosomal frameshifting. (B) Representación esquemática de los tres ORF destacando los motivos más característicos de cada uno de ellos; donde TM: dominio transmembrana; PRO: motivo de proteasa; HDS: triada catalítica de la proteasa de serina; NLS: secuencia de localización nuclear; HVR: región hipervariable; IRE: epítipo inmunoreactivo; POL: motivo de RNA polimerasa; YGDD: aminoácidos conservados en el sitio activo de la RNA polimerasa; RB: zona rica en residuos básicos; Regiones I a IV: regiones variables y conservadas entre serotipos (se explican a detalle en el texto 1.2.6.3.); Los números indican residuos de aminoácidos.

El ORF1a está precedido por una secuencia no traducida (5'-UTR) de una longitud de 80-85 bases. En el ORF1a destaca un motivo de proteasa de serina y en el ORF1b un motivo de RNA polimerasa dependiente de RNA. Entre el ORF1a y el ORF1b existe un solapamiento de 61-73 bases (Figura 1.2 (A)). El ORF2 codifica para una única poliproteína que da lugar a las diferentes proteínas de la cápside una vez que se ha formado el virión. El solapamiento entre el ORF1b y el ORF2 es de 8 bases (Figura 1.2 (A)). En el extremo 3' del genoma hay otra secuencia no traducida (3'-UTR) y una cola de una treintena de adeninas.

1.2.6.1. Poliproteína no estructural del ORF1a

La poliproteína codificada a partir del ORF1a (nsP1a) consta de 920-935 aminoácidos (Figura 1.2.B). En el extremo amino-terminal de la poliproteína se han identificado varios dominios con características de hélices transmembranales que pueden estar implicados en el anclaje del complejo de replicación del RNA viral a membranas celulares (Jiang y col., 1993; y Jonassen y col., 2003). Todos los virus con genomas de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva (ssARN (+)) conocidos a la fecha se replican asociados a algún tipo de membrana dentro de la célula. En la parte central de la poliproteína se encuentra un motivo de proteasa viral perteneciente al grupo de las proteasas de serina que posee un elevado grado de homología con las proteasas de dos virus de la familia *Caliciviridae*: el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV, *rabbit hemorrhagic disease virus*) y el calicivirus felino (Jiang y col., 1993). La tríada catalítica de esta proteasa está formada por los aminoácidos His461, Asp489 y Ser551. En el extremo carboxi-terminal se ha identificado la presencia de una posible señal de localización nuclear (NLS) que, aunque su significado biológico en el ciclo replicativo de astrovirus no está claro, podría dirigir el transporte de proteínas virales hacia el núcleo en

algún momento del ciclo replicativo de astrovirus (Jiang y col., 1993). En esta zona de la poliproteína también se ha descrito la presencia de un epítipo inmunoreactivo (Matsui y col., 1993) y de un dominio de muerte (DD, *death domain*) relacionado con la activación del proceso de apoptosis en las células infectadas (Guix y col. 2004). Finalmente, cabe destacar la presencia de una región hipervariable (HVR) rica en inserciones y deleciones en el extremo carboxi-terminal y que en un principio se asoció a la adaptación de astrovirus a determinadas líneas celulares (Willcocks y col., 1994a).

1.2.6.2. Poliproteína no estructural del ORF1b

El ORF1b codifica para una poliproteína (nsP1b) de entre 515 y 519 aminoácidos (Figura 1.2 (B)). En esta poliproteína destaca la presencia de un motivo de RNA polimerasa dependiente de RNA perteneciente al supergrupo I, según la clasificación de Koonin (Koonin, 1991), aunque aún no se ha caracterizado por completo. Se ha propuesto que el lugar activo de esta RNA polimerasa correspondería a la secuencia aminoacídica YGDD (374-377) altamente conservada en astrovirus humanos y animales (Carter y Willcocks, 1996). A pesar de que el ORF1b posee un potencial codón de inicio de traducción, aproximadamente 400 nt después del inicio del ORF, se ha demostrado que la síntesis de la poliproteína tiene lugar tras un fenómeno de *ribosomal frameshifting* que se produce en la región de solapamiento entre el ORF1a y el ORF1b. De este modo se forma una poliproteína que incluye el ORF1a y el ORF1b (nsP1a/1b) (Jiang y col., 1993; Marczinke y col., 1994) y que es procesada posteriormente a nsP1b y varias otras proteínas derivadas de nsP1a

1.2.6.3. Poliproteína estructural del ORF2

La poliproteína codificada por el ORF2 tiene un tamaño variable según el serotipo de astrovirus que oscila entre 782 y 796 aminoácidos (Figura 1.2.(B)). En un estudio realizado por Wang y col. (2001), en donde compara la secuencia de varias cepas de astrovirus, la proteína derivada del ORF2 fue dividida en cuatro regiones. La región I, que abarca la secuencia entre los aminoácidos 1 y 415, es la que está más conservada entre todos los serotipos del virus. En esta región existe una zona rica en residuos básicos (hacia el amino terminal de la proteína) que se ha relacionado con el empaquetamiento del RNA vírico (Geigenmüller y col., 2002b). La región II (entre los aminoácidos 416 y 648) presenta un ligero grado de variabilidad entre los diferentes serotipos mientras que la similitud dentro de cada serotipo es elevada. La región III (desde el residuo 649 al 707) es la zona con mayor grado de variabilidad entre los diferentes serotipos con presencia de inserciones y/o deleciones. Finalmente, la región IV (desde el residuo 708 al final) vuelve a presentar un elevado grado de similitud entre todos los serotipos.

1.2.7. Procesamiento Proteolítico de las Poliproteínas

1.2.7.1. Proteínas no estructurales

Los ORF1a y ORF1b se traducen simultáneamente produciendo nsP1a y nsP1ab, la cual resulta por un fenómeno de *ribosomal frame shifting* que determina el cambio en el marco de lectura. Este motivo (RFS) está compuesto por una secuencia heptanucleotídica (motivo A₆C), que precede al sitio en donde ocurre el cambio de fase sobre el RNA viral y que está

localizado al final del ORF1a (Lewis y col., 1996, Lewis y col., 1997 y Marczinke y col., 1994). Como producto final se expresa una poliproteína de 160 kDa (nsP1ab) que posteriormente es procesada para generar proteínas más pequeñas, aunque no se conocen los sitios exactos de procesamiento. Se cree que el procesamiento de la poliproteína codificada por estos ORFs a proteínas más pequeñas se lleva a cabo principalmente por la proteasa viral, codificada en el ORF1a, aunque algunas proteasas celulares puedan ser responsables del corte en el extremo amino para generar la proteína de 18-20 kD.

Actualmente, el modelo más aceptado para explicar el procesamiento de las poliproteínas nsP1a y nsP1ab de astrovirus humanos es un compendio de resultados obtenidos en diferentes laboratorios (Gibson y col, 1998; Willcocks y col., 1999; Geigenmüller y col., 2002a; Kiang y Matsui, 2002; y Méndez y col.; 2003). Según este modelo, la poliproteína de 160 kDa se procesa para dar lugar a una RNA polimerasa dependiente de RNA de 57 kDa (nsP1b) y una poliproteína de 102 kDa (nsP1a). La proteína nsP1a es posteriormente procesada hasta dar lugar a cuatro proteínas finales (nsP1a/1, nsP1a/2, nsP1a/3 y nsP1a/4), aunque no se conoce con exactitud los sitios donde ocurren los cortes (Figura 1.3). De las cuatro proteínas derivadas de la nsP1a, la nsP1a/3 corresponde a la putativa proteasa viral de unos 28 kDa (Jiang y col., 1993).

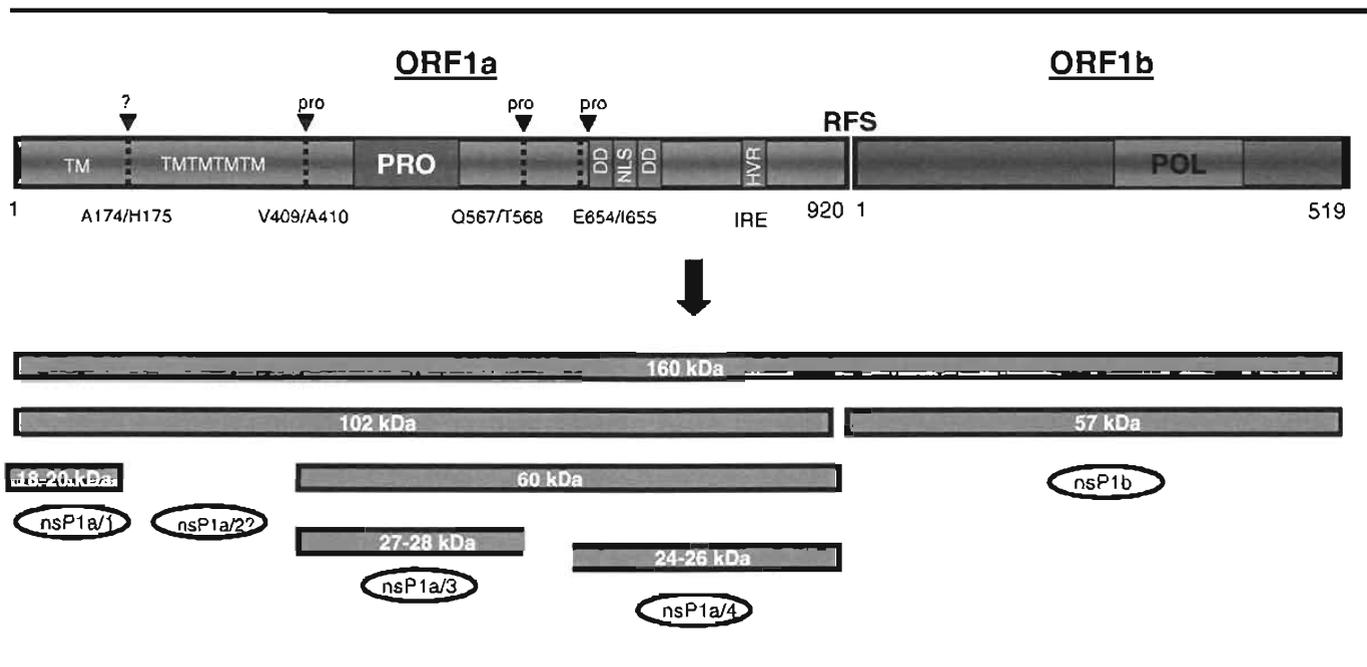


Figura 1.3: Modelo de procesamiento de la poliproteína que da lugar a las proteínas no estructurales del virus (nsP) resultantes de la traducción del ORF1a y ORF1b. Los triángulos invertidos señalan posibles sitios de procesamiento proteolítico por la proteasa vírica (pro) o proteasas celulares (?); donde RFS: señal de ribosomal frameshifting; TM: dominio transmembrana; PRO: motivo de proteasa; NLS: señal de localización nuclear; HVR: región hipervariable; IRE: epítipo inmunoreactivo; POL: motivo de ARN polimerasa.

1.2.7.2. Proteínas estructurales

A pesar de que ha sido uno de los temas más estudiados por diferentes grupos, el procesamiento de la poliproteína de 87-90 kDa obtenida por traducción del ORF2, así como el ensamblaje de las proteínas dando lugar a cápsides virales, siguen siendo fuente de controversia y discusión. En general, se considera que las cápsides virales infecciosas están compuestas por tres proteínas mayoritarias con un tamaño de 35-32 kDa (VP34), 31-27 kDa

(VP29) y 26-24 kDa (VP26) (Willcocks y col., 1990; Monroe y col., 1991; Belliot y col.; 1997a; y Bass y Qiu; 2000), que provienen de cortes proteolíticos de una proteína precursora, que es el producto primario de la traducción de ORF2.

La proteína VP34 corresponde al extremo amino-terminal de la proteína codificada por el ORF2, mientras que la proteína VP26 parece ser una versión truncada por el extremo amino-terminal de la proteína VP29, correspondiente a la parte central de VP87-VP90 (Sánchez-Fauquier y col., 1994; y Belliot y col., 1997a). Son varios los modelos propuestos para explicar la formación de las cápsides virales a partir de la poliproteína estructural (Bass y Qiu, 2000; Geigenmüller y col., 2002b; y Méndez y col., 2002). Todos ellos coinciden en que la poliproteína de 87-90 kDa es traducida a partir del RNA subgenómico y que esta poliproteína, se ensambla en el interior de la célula dando lugar a partículas virales con baja infectividad. Sin embargo, los diferentes modelos difieren en establecer cómo se lleva a cabo el procesamiento intracelular de la poliproteína (Figura 1.4).

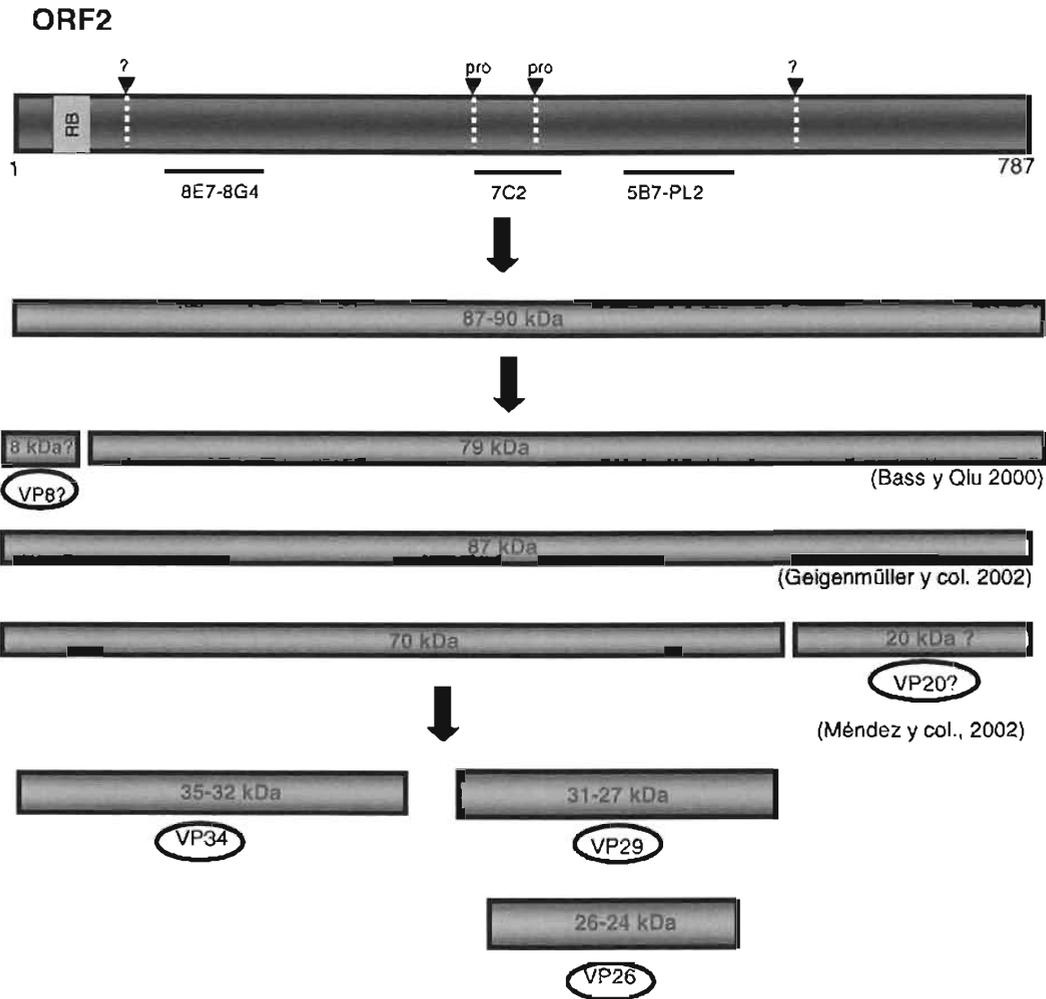


Figura 1.4: Modelos de procesamiento de la poliproteína resultante del ORF2 que da lugar a las proteínas estructurales del virus (VP). Los triángulos invertidos señalan posibles lugares de procesamiento proteolítico por la proteasa viral (pro) o proteasas celulares (?); donde RB: dominio rico en residuos básicos. También se mapan los lugares de reconocimiento de algunos de los diferentes anticuerpos monoclonales existentes frente a la cápside del virus (8E7,8G4, 7C2, 5B7 y PL2)

Para el astrovirus serotipo 1, Bass y Qiu (2000) propusieron que la poliproteína de 87 kDa era procesada en el extremo amino-terminal dando lugar a un precursor de 79 kDa que se ensambla en cápsides inmaduras. Posteriormente, Geigenmüller y col. (2002b) refutaron este

modelo y propusieron que era directamente la poliproteína de 87 kDa traducida a partir del RNA subgenómico la que se estructuraba dando lugar a las cápsides virales sin necesidad de un procesamiento proteolítico previo. Finalmente, Méndez y col. (2002) propusieron, para el astrovirus serotipo 8, que la poliproteína de 90 kDa presente en cápsides inmaduras era procesada por el extremo carboxi-terminal resultando en la maduración del virus que está compuesto por una poliproteína de 70 kDa.

Todos estos modelos convergen en la idea de que las partículas virales son liberadas al exterior de la célula y entonces la tripsina actúa sobre ellas dando lugar a partículas que contienen las tres proteínas (VP34, VP29, VP26), haciendo que el virión sufra un considerable incremento en su capacidad infectiva. La necesidad que tiene el astrovirus de ser procesado por tripsina para alcanzar mayor infectividad se puede explicar por el hecho de que el sitio que infecta el virus de manera natural (intestino delgado), es donde existen altas concentraciones de esta enzima.

1.2.8. Características Físico-Químicas

Los astrovirus son resistentes a pH ácidos (pH 3), desecación, cloroformo, una gran variedad de detergentes tanto no-iónicos como aniónicos y solventes lipídicos. Sin embargo, no resisten temperaturas elevadas durante largos períodos de tiempo (1 h a 50 °C ó 5 min a 60 °C), concentraciones de cloro libre superiores a 1 mg/l y ciclos de congelación / descongelación repetidos; aunque mantienen su integridad después de 10 años a temperaturas de -70 °C (Kurtz y Lee, 1987; Williams, 1989; Abad y col., 1997; y Abad y col, 2001).

Respecto a la densidad de las partículas virales, varios autores han descrito que al purificar una suspensión de astrovirus (ya sea proveniente de muestras fecales como de cultivo celular) en gradientes de CsCl, las partículas virales se distribuyen típicamente en dos picos antigénicos con el mismo patrón proteico y con densidades de 1.37-1.35 g/ml y 1.33-1.32 g/ml respectivamente. La presencia de RNA viral en el pico de mayor densidad, y su ausencia en el pico de menor densidad, sugiere que el primero corresponde a partículas infecciosas, mientras que el segundo corresponde a partículas virales sin ácido nucleico en su interior (Caul y Appleton, 1982; Willcocks y col., 1990; y Matsui y col., 1993). Un punto importante a considerar en la purificación de astrovirus mediante gradientes de CsCl es la estabilidad de las partículas virales por la presencia de iones divalentes (principalmente Ca^{2+}). Mientras que para otros virus la presencia iones divalentes (Ca^{2+} y/o Mg^{2+}) claramente aumenta su estabilidad, en el caso de astrovirus esto aún no se ha definido, aunque se ha reportado que partículas virales pueden purificarse en presencia de EDTA (Sánchez-Fauquier, 1994). Además de los gradientes de CsCl para la purificación de astrovirus, también se han utilizado gradientes de tartrato potásico argumentando que preservaban mejor la integridad de los virus (Ashley y Caul 1982). En este medio, los astrovirus bandean a una densidad de 1.32 g/ml.

1.3. ASPECTOS CLÍNICOS DE LAS INFECCIONES POR ASTROVIRUS

1.3.1. Transmisión, Patogénesis y Sintomatología

Los astrovirus son transmitidos típicamente por la vía fecal-oral a través de la ingestión de alimentos contaminados o por contacto con fomites previamente contaminados con el virus. Estudios con voluntarios han demostrado que la ingestión de preparados a partir de extractos de

heces de individuos con gastroenteritis causadas por astrovirus puede provocar la aparición de la sintomatología de la enfermedad y la presencia de partículas virales en las heces de los voluntarios afectados (Kurtz y col., 1979; y Midthun y col., 1993).

A diferencia de lo que sucede con los calicivirus, las infecciones por astrovirus en adultos suelen presentar una sintomatología muy leve o incluso ser asintomática. Este hecho sugiere que los adultos podrían actuar como hospederos de astrovirus. Los niños, por el contrario, son más susceptibles a la infección, en los cuales pueden presentarse brotes epidémicos con sintomatología variable, que ocasionalmente puede llegar a ser grave.

La patogénesis de las infecciones causadas por astrovirus en humanos es un tema que no se conoce bien, y casi todos los datos de que se dispone son extrapolados de estudios realizados en animales. De este modo, se ha demostrado que en los ovinos, el virus infecta los enterocitos maduros por la zona apical de las microvellosidades conduciendo a una atrofia del tapete de microvellosidades y a una hipertrofia de las criptas. Los ovinos infectados experimentalmente desarrollan la sintomatología a los 2-4 días de la ingestión del virus y excretan partículas virales entre los días 2 y 9 (Snodgrass y Gray, 1977; y Snodgrass y col., 1979). Por regla general, la gastroenteritis aguda causada por astrovirus se caracteriza por un cuadro de diarrea líquida con una duración de <2 días precedida o acompañada por vómitos, fiebre, anorexia y/o dolor abdominal. Esta sintomatología no es distinguible de otras causadas por la infección de otros virus como rotavirus o calicivirus, pero usualmente es más leve y no incluye problemas graves de deshidratación.

Durante el periodo de la infección, a nivel celular se observan inclusiones intracitoplasmáticas, vacuolas en el citoplasma y degeneración del núcleo; características típicas de un proceso de apoptosis. Estudios *in vitro* han mostrado la existencia de una vía endocítica para la internalización de los virus en el interior celular (Donnelly y col., 1992). Recientemente, Guix y col. (2004) han demostrado que la infección de la línea celular CaCo-2 con astrovirus humanos provoca apoptosis a partir de las 24 hrs post-infección existiendo una correlación directa entre la proporción de células apoptóticas en el cultivo y la multiplicidad de infección del virus utilizada.

1.3.2. Epidemiología

Las infecciones causadas por astrovirus ocurren en todos los lugares del mundo (Glass y col., 1996), y principalmente afectan a la población infantil, pero también se han descrito casos en adultos (Gray y col., 1987; Lewis y col., 1989; Oishi y col., 1994; Belliot y col., 1997b; y Pager y Steele, 2003). A pesar de tratarse de cuadros sintomáticos leves, cabe tener en cuenta a los astrovirus dentro del marco de la salud pública ya que se han asociado en numerosas ocasiones a brotes de gastroenteritis en escuelas, guarderías, centros geriátricos y hospitales. De igual modo, se ha de tener consideración especial a aquellos pacientes que estando inmunosuprimidos adquieren una infección por astrovirus, ya que se han documentado casos en los que la sintomatología incrementa su severidad con respecto a pacientes no inmunosuprimidos (Wood y col., 1988; Björkholm y col., 1995; Cubbit y col., 1999; Coppo y col., 2000; y Cunliffe y col., 2002).

La incidencia de gastroenteritis causadas por astrovirus usualmente oscila entre el 2.5% y el 10% (Gaggero y col., 1998; Bon y col., 1999; Foley y col., 2000; y Guix y col., 2002), sin embargo, puede llegar a encontrarse hasta en un 26% en algunas poblaciones aisladas (Maldonado y col., 1998).

La prevalencia de infecciones por astrovirus varía en función de los grupos de edad, pero en general es mayor en niños menores de dos años (Guix y col., 2002). Estudios de seroprevalencia han puesto de manifiesto que la mayoría de los niños adquieren anticuerpos frente a astrovirus durante los primeros años de vida (Kriston y col., 1996; y Koopmans y col., 1998).

Hasta la fecha, se han identificado ocho serotipos de astrovirus en humanos (HAst 1-8) por ensayos de inmunofluorescencia, neutralización y microscopia electrónica inmunoabsorbente utilizando sueros hiperinmunes producidos contra las partículas virales (Herrmann y col., 1988, Hudson y col., 1989, Kurtz y col., 1984 y Lee y col., 1994). Por otro lado el análisis de la secuencia nucleotídica de una región de 137 aminoácidos de ORF2 ha permitido agrupar a HAst en 8 genotipos (Belliot 1997c). De esta manera se ha encontrado co-relación entre estos dos sistemas de clasificación. Distintos reportes han demostrado que el serotipo 1 de astrovirus (HAstV-1) es considerado el más prevalente en todo el mundo (Shastri y col., 1998; Medina y col., 2000; Mustafa y col., 2000; Traore y col., 2000; Guix y col., 2002; y Kang y col., 2002), y que los serotipos HAstV-6 y HAstV-7 son los menos frecuentes (Lee y Kurtz, 1994; y Naficy y col., 2000). Los virus pertenecientes al serotipo 8 han sido aislados raramente a nivel mundial (Belliot y col., 1997b y Mustafa y col., 2000); sin embargo, hay quien ha propuesto que este serotipo puede ser más común de lo que se considera actualmente y podría representar un

serotipo emergente (Mustafa y col., 2000). Se han descrito varios casos de coinfección de astrovirus con otros patógenos tanto fúngicos como bacterianos y virales (Shastri y col., 1998; Guix y col., 2002; y Román y col., 2003), e incluso casos de coinfección entre diferentes serotipos de astrovirus (Matsui y col., 1998; y Pang y Vesikari, 1999).

Al igual que sucede con otros virus entéricos como rotavirus, las infecciones por astrovirus son más frecuentes en los meses fríos y/o lluviosos del año, y se ha propuesto un patrón de incidencia bianual (Lee y Kurtz, 1994; Mustafa y col., 2000; y Guix y col., 2002)

También se han descrito casos que no siguen este patrón de estacionalidad, sobre todo en países con clima más uniforme a lo largo de todo el año como México y Egipto (Guerrero y col., 1998; y Naficy y col., 2000).

Inicialmente los estudios epidemiológicos estuvieron basados en la identificación del virus por microscopía electrónica; posteriormente la generación de un anticuerpo monoclonal que reconoce un antígeno de grupo, es decir, que reacciona con todos los serotipos de astrovirus humano, permitió el desarrollo de ensayos inmunoenzimáticos para la detección del virus en muestras clínicas. Recientemente la determinación de la secuencia nucleotídica de genomas de algunas cepas de astrovirus condujo al desarrollo de ensayos aún más sensibles para su detección, tal como la transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (Matsui y Greenberg., 2001a). Estos avances han contribuido al conocimiento real sobre la prevalencia de astrovirus en la población y a su reconocimiento como causa de gastroenteritis.

1.3.3. Inmunidad

Las infecciones por astrovirus que presentan sintomatología se producen principalmente en dos grupos de personas: niños e individuos de avanzada edad. Debido a esta distribución, se cree que la inmunidad frente al astrovirus se adquiere en las primeras etapas de la vida y permanece inalterada durante la madurez, pero empieza a debilitarse al final de la vida de la persona. Concretamente, un estudio realizado por Mitchell y col. (1999) puso de manifiesto que el 96% de los niños menores de 9 años poseían anticuerpos contra el serotipo HAstV-1.

Aún no se sabe si existe, y si es importante en protección, la inmunidad cruzada entre los diferentes serotipos. La mayoría de los datos epidemiológicos sugieren el desarrollo de una inmunidad homotípica pero no heterotípica (Mitchell y col., 1999; Naficy y col., 2000; y Guix y col., 2002). Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que la mayoría de los brotes en adultos son debidos a virus comprendidos entre los serotipos encontrados menos frecuentemente en estudios epidemiológicos realizados sobre la población infantil (Midthum y col., 1993; Oishi y col., 1994; y Belliot y col., 1997b).

La mucosa intestinal juega un papel crucial en la adquisición de inmunidad frente a repetidas infecciones por astrovirus. Los linfocitos T de la lámina propia intestinal reconocen de forma específica a los antígenos de superficie de los astrovirus y al activarse, producen citocinas, entre ellos, interferón gamma y factor de necrosis tumoral desencadenando una respuesta inmune (Molberg y col., 1998).

1.3.4. Tratamiento y Control de la Enfermedad

Las gastroenteritis causadas por los astrovirus son generalmente suaves, autolimitantes y no suelen requerir tratamientos específicos. En casos de principio de deshidratación del paciente se puede aplicar una terapia de rehidratación vía oral o intravenosa. En casos más extremos, como pacientes inmunosuprimidos, se ha llegado a administrar inmunoglobulina intravenosa como medida de prevención sin estar muy clara su eficacia específica frente a la infección (Björkholm y col., 1995; y Yuen y col, 1998).

La manera más fácil de evitar una infección por astrovirus es prevenir su transmisión, es decir, obstaculizar las rutas de transmisión del virus hacia las personas. Esto es especialmente importante donde el contacto entre personas es continuo e indiscriminado como en guarderías, escuelas, hospitales y centros asistenciales. Por lo tanto, la primera medida a implementar es establecer unas exigencias mínimas de higiene. Al tratarse de virus de transmisión fecal-oral, es importante tener conciencia de que los alimentos pueden llegar a ser una fuente importante de contaminación vírica. Por ello, es importante que los alimentos sean manipulados de forma adecuada y que el agua destinada al consumo humano esté debidamente depurada.

Especial mención merece los *fomites* o superficies potencialmente transmisoras de contaminación (Abad y col., 2001). Estas superficies deberían someterse a desinfección periódica, y se ha demostrado que para ello el metanol al 70% es más efectivo que concentraciones similares de etanol o concentraciones superiores de metanol (Kurtz y col., 1980).

Finalmente, en lo referente a una futura vacuna, es muy pronto para el desarrollo de ésta ya que aún se necesita un mayor conocimiento de los fundamentos de la biología de astrovirus. Cuando éstos estén firmemente establecidos, no cabe duda que los intentos de obtener una vacuna frente astrovirus irán encaminados a que sea efectiva sobre la mayoría de serotipos existentes y que sea capaz de inducir inmunidad en niños de corta edad (Naficy y col., 2000).

2.1.- Antecedentes

Debido a la información tan escasa sobre la biología molecular de los astrovirus, incluyendo aquella referente al procesamiento de sus poliproteínas, decidimos adaptar una cepa de astrovirus humano nativo de México a cultivos celulares para usarlo como modelo en nuestro laboratorio. El virus fue propagado en la línea celular CaCo-2 derivada de un carcinoma de colon humano durante siete pases. Su aislamiento se confirmó por diversos métodos (microscopía electrónica, RT-PCR, inmunotinción con anticuerpos monoclonales); posteriormente la cepa se caracterizó molecularmente. El presente trabajo involucra aspectos iniciales en la caracterización de esta cepa, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos.

3.1.- Objetivo General

Analizar la estructura primaria y estudiar la expresión y el procesamiento de la región no estructural del genoma de astrovirus humano (Yuc-8).

3.2.- Objetivos Específicos:

- 1.- Determinar la secuencia nucleotídica de las regiones correspondientes a los ORF1a y ORF1b de la cepa de astrovirus Yuc-8 .**
- 2.- Clonar la región correspondiente a los ORF 1a y ORF 1b de la cepa Yuc-8.**
- 3.- Producir sueros contra proteínas de fusión que incluyan diferentes regiones del ORF1a.**
- 4.- Determinar la reactividad de sueros dirigidos contra las proteínas derivadas de los ORF1a y ORF1b en un sistema de expresión eucarionte y en células infectadas por el virus.**

4.1.- Materiales y Métodos

4.1.1.- Extracción de RNA de astrovirus a partir de heces y/o células infectadas

- 1.- Preparar una dilución de 1:10 de la muestra de heces en PBS estéril y centrifugar a baja velocidad para separar los sólidos pesados. En el caso de células infectadas se lisan con trizol (Gibco-BRL 15596-018).directamente de la monocapa.
- 2.- Agregar 500 µl de Freón y mezclar en vortex
- 3.- Centrifugar a 14,000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente.
- 4.- Recuperar el sobrenadante y pasarlo a un tubo de 11X36 mm (polycarbonate ultracentrifuge) para el rotor Beckman TLX 100.2 y centrifugar a 55,000 rpm durante 40 min a 4°C en la ultracentrifuga de mesa TLX100.2
- 5.- Descargar el sobrenadante y disolver la pastilla con 200 µl de trizol
- 6.- Agregar 200 µl de cloroformo y mezclar en vortex.
- 7.- Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min a 4°C y precipitar el RNA contenido en el sobrenadante con un volumen de isopropanol durante 1 hr a -20°C
- 8.- Centrifugar a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C y lavar la pastilla con etanol absoluto.
- 9.- Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min a 4°C, remover el etanol absoluto y resuspender la pastilla en 10 µl de agua estéril.

Nota: Todo el material usado debe ser estéril y libre de RNAsas y trabajar en hielo.

4.1.2.- Transcripción Reversa (RT)

RNA-Oligonucleótido:

1.- En un tubo de microcentrífuga de 0.6 ml, mezclar 3 μ l de RNA de astrovirus (extraído como se describió en el protocolo anterior) 1 μ l de oligonucleótido de polaridad negativa 1 μ M y 7.6 μ l de agua estéril y libre de RNAsas.

2.- Incubar durante 10 min a 70°C e inmediatamente pasar el tubo a hielo.

RT-Mix:

1.- En otro tubo de microcentrífuga de 0.6 ml, mezclar 4 μ l de amortiguador 5X de Superscript II, 2 μ l de DTT 0.1M, 2 μ l de dNTP 5 mM, 0.2 μ l de ARNsin y 0.2 μ l de Transcriptasa Reversa Superscript II (Gibco-BRL).

2.- Mezclar con el RNA-Oligonucleótido e incubar durante 90 min a 42°C y finalmente incubar durante 5 min a 94°C.

4.1.3.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

1.- Mezclar en un tubo de Microcentrífuga 2 μ l de cDNA, 1 μ l de oligonucleótido de polaridad positiva (25 μ M), 1 μ l de oligonucleótido de polaridad negativa (25 μ M), 2.5 μ l de amortiguador 10X (Vent DNA polimerasa), 2 μ l de dNTP 5mM, 16.2 μ l de agua esterilizada y 0.3 μ l de la enzima Vent DNA polimerasa (New England Biolabs). Posteriormente incubar en un termociclador (Perkin Elmer) bajo las siguientes condiciones:

1 ciclo*	□	20 seg a 94°C
30 ciclos	┌	30 seg a 94°C
		30 seg a 50°C**
		2.5 min a 70°C
1 ciclo	□	7 min a 72°C

* Esta condición solo se incluye en el primer ciclo de corrida con la finalidad de desnaturalizar la muestra y garantizar la unión de los oligonucleótidos al cDNA templado.

** La temperatura de annealing puede variar de acuerdo a la Tm de los oligonucleótidos usados.

4.1.4.- Oligonucleótidos utilizados para clonar y secuenciar el RNA de la cepa Yuc-8

Clave de los oligonucleótidos	Secuencia	Posición en Yuc-8 (nt)	Polaridad
Ast1-20*	CCAAGAGGGGGGTGGTGATT	1-20	+
orf1a-1*	CCATGCCATGGCACACCGTGAGCC	77-100	+
orf1a-7	GTTCTCCTCTTTCGGTGG	458-441	-
orf1a-5	TCGCCTTTGTACCTAGAGC	763-781	+
orf1a-6	GGGGTCAATGACTTCGTAG	1356-1374	+
orf1a-2	CACTTACTTCTAGAACACC	1665-1647	-
orf1a-3	GTGAATGAAGATCTTGTGG	1647-1665	+
H-Ast2392-409*	TTGCCCCGAACCGAAAGT	2390-2407	+
H-Ast2839-22*	ACTTTTTTGTTCGGGGT	2792-2775	-
Ast-Beg*	ACCGTGCAACCCTCCTCTC	6436-6454	+
Ast-End*	TCCTACTCGGCGTGGCCGC	6676-6658	-
AstMdT	CGTTTTTTTTTTTTTTTT	poli ⁺ A ⁻ -6758	-
Ast1Nsb	GACACGTTGAGAAGATTGACG	4508-4488	-
Ast Mon 269	CAACTCAGGAAACAGGGTGT	4526-4545	+
Ast Mon 270	TCAGATGCATTGTCATTGGT	4956-4975	-

Tabla 4.1: Se describen los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del genoma de Yuc-8. (*) oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia de H-Ast1 (Gene Bank, número de acceso Z25771).

4.1.5.- Purificación de fragmentos de DNA

Se usó el protocolo de purificación de columnas Wizard de Promega

- 1.- Separar las bandas por electroforesis a 80 Volts en minigel de agarosa de bajo punto de fusión de 0.8% al 1% (dependiendo del tamaño del fragmento) teñido con bromuro de etidio.
- 2.- Cortar la banda procurando quitar los excesos de agarosa.
- 3.- Agregar a la banda 150 μ l de amortiguador TAE 1X y 3 μ l de Cloruro de Magnesio 1M, mezclar brevemente y fundirla en un baño durante 5 min a 75°C*
- 4.- Una vez que la agarosa esté completamente fundida agregar 1 ml de resina para unión de DNA y mezclar en vortex durante un min.
- 5.- Acoplar una columna Wizard (Promega A721C) en una jeringa de 3 ml (sin émbolo) depositar la mezcla de resina-DNA y drenar lentamente a través de la columna.
- 6.- Lavar 2 veces con isopropanol grado HPLC ultrapuro (ALDRICH 27,049-0), drenar lentamente**
- 7.- Centrifugar a 14,000 rpm durante 30 seg para remover excesos de isopropanol y dejar durante 1 min a temperatura ambiente.
- 8.- Eluir el DNA con 50 μ l de agua estéril.

* Además de lo descrito arriba puede adicionarse 1 μ l de tRNA (5 μ gr/ μ l) como acarreador para evitar que se pierda DNA cuando se tiene poco.

** Este protocolo puede usarse para purificar DNA de plasmido extraído de cultivo bacteriano cambiando los lavados de isopropanol por amortiguador de lavado (ver reactivos).

4.1.6.- Secuencia de fragmentos de DNA

Fragmentos de DNA (100 ng) obtenidos por PCR* y purificados por columna fueron secuenciados en el secuenciador de DNA automático ABI Prism, modelo 377-18 (Perkin Elmer), utilizando los oligonucleótidos correspondientes (Tabla 4.1)

* Cuando el DNA proviene de cultivo bacteriano se requieren 800 ng de DNA

4.1.7.- Enzimas de restricción y de modificación

Fueron seleccionadas enzimas de restricción y de modificación en base a la estrategia de análisis, clonación o modificación, cada una de ellas se trató con el amortiguador y las condiciones sugeridas por el fabricante.

4.1.8.- Preparación de células *E.coli* electrocompetentes

- 1.- Preparar un cultivo de 5 ml de medio luria con 5 µl de kanamicina a una concentración final de 30 µg/ml , 10 µl de tetraciclina a una concentración final de 10 µg/ml y como inóculo células SURE* e incubar toda la noche en una incubadora de piso con 200 rpm a 37°C.
- 2.- Diluir 1/10 del cultivo en 500 ml de medio SOB en un matraz de 3 lt.
- 3.- Incubar en una incubadora de piso con 200 rpm a 37°C hasta obtener una densidad óptica de 0.5 a 0.6.
- 4.- Cosechar las células centrifugando a 5,000 rpm, 10 min, 4°C.
- 5.- Desechar el sobrenadante y resuspender la células en glicerol al 10% frío.
- 6.- Repetir los pasos 4 y 5 dos veces más.
- 7.- En el último lavado resuspender en 1 ml** de glicerol al 10% frío, hacer alcuotas y congelar en un baño con etanol y hielo seco e inmediatamente guardar a -70°C.

* También se pueden usar células JM101 pero en este caso no se usan antibióticos (paso 1).

** Tener precaución dado que a veces quedan excesos de glicerol y pueden quedar muy diluidas las células con lo que la eficiencia de transformación sería muy baja (menor de 1×10^8 colonias por μg de DNA)

4.1.9.- Transformación de *E. coli* por electroporación

- 1.- Se requiere que el DNA (plasmido ó el vector e inserto previamente ligado y purificado) esté libre de sales.
- 2.- Mezclar en un tubo de microcentrífuga 40 μl de células electrocompetentes y el DNA (plasmido superhelicoidal o plasmido-inserto ligados)
- 3.- Pasar a una celda de electroporación de 1 mm de gap (Modelo 610 BTX)
- 4.- Usar un electroporador (BioRad) bajo las siguientes condiciones: 1.6KV, 25 μFD , 200 Ohms
- 5.- Dar un pulso (aproximadamente 4.5 seg) e inmediatamente agregar 1 ml de medio SOC, enjuagar la celda y se pasar todo a un tubo de microcentrífuga.
- 6.- Dejar en recuperación las células en una estufa durante 1 hr a 37°C.
- 7.- Platear la células en una caja petri con medio luria sólido y el antibiótico correspondiente al que tenga resistencia el plasmido en cuestión.
- 8.- Incubar a 37°C hasta detectar colonias.

4.1.10.-Purificación de plásmidos (minipreps) con columnas Wizard de Promega

- 1.- Preparar un cultivo de 5 ml de medio luria con antibiótico (por ejemplo ampicilina a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$), inocular una colonia de bacteria e incubar toda la noche en una incubadora de piso con 200 rpm a 37°C.
- 2.- De los 5 ml de cultivo, mezclar 900 μl con 100 μl de glicerol estéril y almacenar a -70°C, lo cual servirá para cultivos posteriores.

- 3.- Centrifugar el volumen del cultivo restante y desechar el sobrenadante.
- 4.- Resuspender la pastilla con 200 μ l de solución para resuspender (se puede hacer con pipeta hasta que no queden grumos), agregar 200 μ l de solución de lisis (las células toman una apariencia clara) finalmente agregar 200 μ l de solución neutralizante y se dejar reposar 5 min en hielo.
- 5.- Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
- 6.- Colectar el sobrenadante y mezclar con 1 ml de resina para unión de DNA y seguir el protocolo de purificación de DNA por columnas Wizard de promega, con la excepción de que en lugar de usar isopropanol se usa buffer de lavado (ver reactivos).

4.1.11.- Análisis del tamaño de plásmidos por lisis directa de bacterias (Toothpick)

- 1.- Seleccionar colonias, picar cada una de ellas con un palillo y sembrar en una caja con medio luria sólido.
- 2.- Dejar en incubación a 37°C hasta que sean visibles las colonias.
- 3.- Picar con un palillo la colonia y depositarla en el fondo de un tubo de microcentrífuga.
- 4.- Agregar 20 μ l de amortiguador de lisis y mezclar vigorosamente en vortex.
- 5.- Incubar durante 15 min a 65°C y centrifugar a 14,000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente.
- 6.- Analizar por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 80 Volts. El gel se carga en seco, es decir el amortiguador de corrida solo toca los extremos del gel y la muestra debe entrar al gel subiendo el voltaje a 160 Volts. Posteriormente agregar el resto de amortiguador de corrida y dejar hasta que el colorante llegue al borde del gel, teñir con bromuro de etidio y lavar dos veces con agua. Esta técnica sirve para determinar el tamaño relativo de los plásmidos que contienen o no el inserto clonado.

4.1.12.- Inducción de proteínas expresadas en bacteria

- 1.- Preparar un cultivo de 5 ml de medio luria con el antibiótico correspondiente para el vector, como inóculo una colonia de bacteria e incubar toda la noche en una incubadora de piso con 200 rpm a 37°C.
- 2.- Tomar 200 µl del cultivo anterior (el resto se usa para hacer un stock de glicerol y para miniprep) y agregar 1.8 ml de medio luria con antibiótico e incubar durante 3 hrs en una incubadora de piso con 200 rpm a 37°C.
- 3.- Separar el cultivo en dos tubos: al tubo 1, agregar 1 ml de cultivo y el inductor Isopropyl B-D-Thiodgalactopyranoside (IPTG, 1 mM final) y al tubo 2, agregar 1 ml de cultivo, pero no se le adiciona IPTG, el cual se usará como control negativo. Incubar durante 3 hrs en una incubadora de piso con 200 rpm a 37°C.
- 4.- Cosechar las células por centrifugación y agregar a la pastilla 100 µl de mezcla disruptora (Magic Mix) 2X con beta mercaptoetanol al 2%. Mezclar vigorosamente en vortex.
- 5.- Analizar el patrón de proteínas por electroforesis a 12 mA en gel de poliacrilamida con SDS y teñir con azul de coomasie.

4.1.13.- Geles de poliacrilamida-SDS

- 1.- Preparar un gel al 11%, una vez que polimeriza, en la parte superior se adiciona un gel 4%, en donde se forman los carriles.
- 2.- Mezclar las muestras con el colorante amortiguador de muestra y se hierven durante 3 min, posteriormente cargar en los carriles del gel.
- 3.- Como amortiguador de corrida se utiliza Tris-Glicina-SDS.
- 4.- Realizar la corrida aplicando 12 mA hasta que el colorante alcance el final del gel.

5.- Una vez terminada la corrida teñir el gel con azul de Coomassie, o cuando las proteínas están radiactivas se puede secar en un secador de geles para exponer en una película fotográfica.

4.1.14.- Electroelución de proteínas

1.- Preparar un gel preparativo de poliacrilamida-SDS al 15% y correrlo a 3 mA hasta que el indicador llegue al extremo del gel. Teñir con azul de Coomassie.

2.- Cortar la banda de la proteína y seccionarla en trozos de aproximadamente 2 mm e incubarlas con amortiguador de carga que las cubra durante 1 hr a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

3.- Preparar la cámara de electroelución con membranas de diálisis hervidas y lavadas.

4.- Colocar las bandas con el amortiguador de carga en la cámara de electroelución.

5.- Llenar ambas cámaras con amortiguador de corrida y correr a 3 Watts durante 40 a 60 min.

6.- Colectar y volver a llenar con amortiguador de carga, colectar hasta que desaparezca el color azul de las bandas.

7.- Analizar la cantidad de proteína recuperada por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

8.- Confirmar la identidad de la proteína por la técnica de Western Blot

4.1.15.- Preparación de la muestra para inmunización

1.- Determinar la concentración de proteína comparando con concentraciones conocidas de una proteína que se usa como estandar. Usar alrededor de 500 µg por inoculación.

2.- Mezclar la proteína con un volumen igual de Adyuvante completo, el cual contiene aceite mineral y *Mycobacterium tuberculosis* para potenciar la respuesta inmune.

3.- Agitar durante 30 min en vortex hasta formar una emulsión.

4.- Previo a la inmunización tomar una muestra de sangre para tener el suero preinmune, posteriormente inmunizar a un conejo de raza New Zeland en cinco puntos.

5.- Inmunizar tres veces más con intervalos de 15 días. Las inmunizaciones se hacen con Adyuvante incompleto y siempre se toman una muestra de sangre para evaluar como está funcionando la respuesta inmune del conejo. Finalmente sangrar a blanco.

Obtención del suero

1.- Incubar la sangre durante una hr a 37°C.

2.-Centrifugar a 1500 rpm durante 10 min y colectar el sobrenadante.

4.1.16.- Western Blot

1.- Separar proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 11%.

2.- Transferir a una membrana de nitrocelulosa (MILIPORE, HAHY00010 de 0.45 μm) usando una cámara de transferencia para minigeles (BIORAD mini protean-3) con amortiguador CAPS 1X-Metanol

3.- Correr a 50 Volts durante 1 hr.

4.- Teñir con el reactivo Ponceau para confirmar la transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa. Desteñir la membrana con agua.

5.- Incubar la membrana en leche descremada al 5%, con agitación y temperatura ambiente durante 1 hr.

6.- Lavar 4 veces con PBS-0.2% Tween

7.- Agregar el anticuerpo en cuestión en PBS-0.2% Tween-0.5% leche descremada.

8.- Incubar toda la noche a 4°C o durante 1 hr y media a temperatura ambiente con agitación.

9.- Lavar 4 veces con PBS-0.2% Tween.

- 10.- Agregar anti IgG de ratón acoplado con Peroxidasa de rábano (1:2000) con PBS-0.2% Tween-0.5% leche descremada.
- 11.- Incubar toda la noche a 4°C o durante 1 hr y media a temperatura ambiente con agitación.
- 12.- Lavar 4 veces con PBS-0.2% Tween.
- 13.- Revelar con reactivo de detección para western blotting (AMERSHAM LIFE SCIENCE luminol) de acuerdo a como recomienda el fabricante.
- 14.- Exponer a película X-OMAT (KODAK 165-1446)

4.1.17.- Cultivo de células

En este trabajo se utilizaron las líneas celulares CaCo-2, BHK, las cuales fueron crecidas en monocapa en frascos de cultivo utilizando medio MEM (Minimum Essential Medium), suplementado con 20% de suero fetal bovino para las células CaCo-2 y 10% para las células BHK. Finalmente se incubaron a 37°C y en un ambiente húmedo con 5% de CO₂.

4.1.18.- Infección de las células con astrovirus humano Yuc-8

- 1.- Activar el lisado viral con tripsina estéril a una concentración final de 10 µg de tripsina por ml de lisado.
- 2.- Incubar durante 30 min a 37°C.
- 3.- Agregar el lisado activado a las células confluentes previamente lavadas con PBS-EDTA e incubar durante 1 hr a 37°C.
- 4.- Retirar el inóculo.
- 5.- Agregar medio MEM sin suero e incubar a 37°C 48 hrs.
- 6.- Congelar-descongelar dos veces y guardar a -70°C.

4.1.19.- Ensayo de Expresión Transitoria

Siembra de células

- 1.- Cultivar 1 frasco F75 con células BHK
 - 2.- Desprender las células con Tripsina/EDTA y resuspender en 3 ml de MEM sin suero.
 - 3.- Contar las células en Hematocitómetro
 - 4.- Centrifugar para ajustar el número de células y el volumen de MEM con suero
- Sembrar 1.5×10^5 células /pozo en cajas de 24 pozos, distribuir homogéneamente.

Infección de células BHK con el virus MVA-T7

- 1.- Infeccionar con MVA-T7* a una moi de 5-10, en presencia de MEM al 2% de suero fetal de bovino

(dejar un pozo control sin infectar)

- 2.- Incubar 1hr a 37°C
- 3.- Lavar 2 veces las células con DMEM (1ml/pozo)
- 4- Aproximadamente 15 min antes de que se cumpla la hr de infeccion realizar lo siguiente:

MEZCLA (1X)

<u>I</u>	<u>II</u>
800 ng de DNA	2 µl de Lipofectamina 2000 (GIBCO BRL 11668-027)
+	+
50 µl DMEM	48 µl de DMEM

- 5.- Mezclar perfectamente I + II (con pipeta)
- 6.- Incubar de 15 a 20 min a temperatura ambiente

7.- Agregar a las células lavadas la mezcla I+II gota a gota y distribuir bien en la monocapa

8.- Agregar DMEM 300 µl/pozo

9.- Incubar 4 hr a 37°C

*MVA-T7 es un virus recombinante que deriva del virus vaccinia y que expresa la RNA polimerasa del fago T7, de manera que esta proteína reconoce su promotor en el plasmido que controla el gene de interés.

Marcaje radioactivo

1.- Retirar el medio

2.- Agregar 300 µl de MEM sin Metionina (que debe de estar a 37°C)

3.- Incubar 15 min a 37°C

4.- Preparar MEM sin Metionina + 30 µci/ml de Express label mix que contiene ³⁵S-Met, ³⁵S-Cys.

5.- Retirar el medio frío

6.- Agregar el medio radiactivo

7.- Incubar 2 hr a 37°C

8.- Lavar 2x con PBS y lisar con 150 µl de Buffer de Lisis (Tris 50 mM pH7.5, SDS 0.5%, EDTA 1 mM, PMSF 1X). Centrifugar en una microcentrífuga eppendorf durante 5 min a máxima velocidad y tomar el sobrenadante

El contenido de proteínas se analiza por electroforesis en geles de poliacrilamida 11% y el gel se expone en una película . Este lisado celular se usa para inmunoprecipitación

9.- Correr gel 11% (guardar a -20°C)

4.1.20.- Inmunofluorescencia

- 1.- Crecer células CaCo-2 sobre un cubreobjeto en cajas de cultivo de 12 pozos.
- 2.- Infectar las células con lisado viral como-se describió anteriormente e incubar desde 14 a 38 hrs posinfección.
- 3.- Fijar las células con formaldehido al 3.7% durante 15 min a 37°C.
- 4.- Lavar con PBS-50 mM NH₄Cl.
- 5.- Permeabilizar con 0.5% de triton X-100 (SIGMA) durante 10 min a temperatura ambiente.
- 6.- Lavar 3 veces con PBS-50 mM NH₄Cl-0.1% albúmina sérica bovina (ASB).
- 7.- Bloquear con 2% de BSA durante 30 min a 37°C.
- 8.- Lavar 3 veces con PBS-50 mM NH₄Cl-0.1% ASB.
- 9.- Agregar el anticuerpo primario (contra proteínas de astrovirus), diluido en 1% de BSA e incubar durante 45 min a 37°C.
- 10.- Lavar 3 veces con PBS-50 mM NH₄Cl-0.1% ASB.
- 11.- Agregar el anticuerpo conjugado con el fluoroforo Alexa 488 diluido 1:100 en 1% de BSA e incubar durante 45 min a 37°C.
- 12.- Lavar 4 veces con PBS-50 mM NH₄Cl-0.1% albúmina y una vez con PBS.
- 13.- En un portaobjetos se coloca una gota de glicerol al 90% y ahí se coloca un cubreobjetos con células.
- 14.- Observar en microscopio de fluorescencia. Las laminillas se pueden almacenar a -70°C para su posterior observación.

4.1.21.- Vectores de clonación y expresión

pRS2 es un vector de 2779 pb el cual es usado debido a que tiene múltiples sitios de clonación, lo cual facilita la inserción de cualquier fragmento. Contiene el marcador de resistencia a ampicilina y se puede amplificar en células JM101 y SURE.

pET28b es un vector de expresión de 5368 pb en el cual se pueden generar proteínas de fusión a colas de histidina para su posterior purificación. Tiene codificado el promotor de la T7 RNA polimerasa y resistencia a kanamicina. Se puede amplificar en células BL21 ó BL21 (DE3).

pADNc 3.1/Hygro es un vector de expresión de 5600 pb el cual se emplea para altos niveles de expresión transitoria o estable de proteínas recombinantes en células de mamífero. Tiene el promotor de la T7 RNA polimerasa, señal de poliadenilación, secuencias para la terminación de la transcripción y origen de replicación de SV40. Resistencia a ampicilina e higromicina B. Se puede amplificar en células JM101.

pGEX 4T-3 es un vector de expresión de 4968 pb en el cual se pueden generar proteínas de fusión a GST y los productos pueden ser purificados directamente por cromatografía de afinidad en glutation sefarosa y la proteína nativa liberada con trombina. Se puede expresar en células JM101 y SURE.

pTM1 es un vector de expresión que se emplea para altos niveles de expresión transitoria o estable de proteínas recombinantes en células de mamífero. Cuenta con el promotor de T7-RNA polimerasa, así que la transcripción del gene clonado está bajo ese promotor y para poder transcribirse se requiere de la T7-RNA polimerasa.

EMCpoly es un vector de 3952 pb con características similares a pTM1, pero con menor número de sitios de restricción para clonar genes heterólogos. Además, este vector posee un sitio IRES derivado del virus EMCV que dirige la traducción de la proteína de interés.

4.1.22.- Programas para análisis de secuencia

Se usaron los programas de análisis de secuencia alojados en las siguientes direcciones de Internet:

<http://pbil.univ-lyon1.fr/>

http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html

<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>

<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>

<http://us.expasy.org/>

También se usaron los software DNA strider, Oligo 4.0, Edit View y Amplified.

4.1.23.- Soluciones

1) PBS	NaCl	8 g/l
	KCl	0.2 g/l
	KH ₂ PO ₄	1.15 g/l
	Na ₂ HPO ₄	1.15 g/l
	CaCl ₂	0.1 g/l
	MgCl ₂	0.1 g/l
2) TAE 50X PH =8.5	Tris Base	242 g/l
	Ácido acético glacial	57.1 ml/l
	Na ₂ EDTA-2H ₂ O	37.2 g/l
	Agua	Cbp 1 l

3) Medio Luria líquido	Extracto de levadura	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	Triptona	10 g/l
	NaOH 10M	0.2 ml/l
4) Medio Luria sólido	Extracto de levadura	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	Triptona	10 g/l
	NaOH 10M	0.2 ml/l
	Bacto Agar	15 g/l
5) SOB	Triptona	20 g/l
	Extracto de levadura	5 g/l
	NaCl	0.584 g/l
	KCl	0.186 g/l
	Agua	Cbp 1l
6) SOC	SOB	98 ml
	Mg ⁺⁺ 2M	1 ml
	Glucosa 2M	1 ml
7) Magic Mix	Tris-Cl, pH 6.8	100 mM
	SDS	4%
	Azul de bromofenol	0.2%
	Glicerol	20%
	β-Mercaptoetanol	1% (adicionar justo antes de usar)
8) Tris Glicina-SDS 10X	Tris Base	24.2 g/l
	Glicina	114 g/l
	SDS	8 ml/l (adicionar justo antes de usar)
9) Azul de Coomassie	Azul de Coomassie	1.25 g/l
	Metanol	450 ml
	Ácido acético glacial	50 ml
	Agua	500 ml
10) CAPS 10X 3-(cyclohexylamino)-1-propane sulfonic acid	CAPS	22.13 g/l
	Agua	900 ml
	Ajustar pH 11 con NaOH	
11) CAPS-metanol	CAPS 10X	10%
	Metanol	10%
	Agua	Cbp 1l
12) Resina de Unión a	Tiocianato de guanidina	11.82 gr
	Tris 1M, pH 7	2.5 ml
	EDTA 0.5M	1 ml

	Resina stock	1 ml
	Agua	Cbp 25 ml
13) Resina stock	Tierra de diatomeas	25 gr
	Agua	500 ml Agitar y reposar durante 3 hrs. La pastilla resuspender en 100 ml de agua.
14) Solución para resuspender (miniprep)	Tris, pH 7.5	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNAsa	10 µg/ml
15) Solución neutralizante (miniprep)	Kaco, pH 4.8	1.55 M
16) Solución de lavado (miniprep)	NaCl	200 mM
Diluir 1:1 en etanol al 95%	Tris, pH 7.5	20 mM
	EDTA	5 mM
17) Amortiguador 5X (electroelución)	Tris base	1.5 gr
	Glicina	7.2 gr
	SDS	0.5 gr
	Agua	Cbp 100 ml
18) Amortiguador de carga (electroelución)	Amortiguador 5X (electroelución)	2 ml
	Agua	98 ml
	SDS 10%	25 ml
19) Amortiguador de corrida (electroelución)	Amortiguador 5X (electroelución)	32 ml
	Agua	128 ml
20) Amortiguador de lisis (toothpick)	NaOH	50 mM
	Glicerol	5%
	SDS	0.5%
	EDTA	5 mM
	Verde de bromocresol	0.1%

5.1.- Resultados

5.1.1.- Obtención de la secuencia genómica de Yuc-8

A partir de células infectadas con la cepa de astrovirus humano adaptada a cultivos celulares, denominada Yuc-8, se extrajo RNA viral y se usó como molde para generar cDNA por RT-PCR usando oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia de H-Ast1 (No. de acceso L23513) previamente determinada y disponible en el banco de genes. Los fragmentos de PCR fueron generados para obtener la secuencia completa del genoma de Yuc-8. Conforme ésta se obtenía, se diseñaban oligonucleótidos propios de Yuc-8 para avanzar en la secuencia hasta completarla. Los primeros pares de oligonucleótidos (descritos en la tabla 4.1) probados para la región de ORF1a y ORF1b fueron H-Ast2392-409/Ast1Nsb generando un fragmento de 2100 pb, orf1a-1/H-Ast2839-22, generando un fragmento de 2712 pb, orf1a-1/orf1a-2 generando un fragmento de 1585 pb y orf1a-3/H-Ast2839-22 generando un fragmento de 1145 pb (Figura 5.1).

Para determinar la secuencia del extremo 5', se diseñó un oligonucleótido de las primeras 20 bases del genoma de astrovirus que están conservadas entre las tres cepas de diferentes serotipos cuya secuencia ha sido reportada. Los oligonucleótidos AstMon 269 y AstMon 270 se utilizaron como control positivo del RT-PCR, los oligonucleótidos Ast1-20 y Orf1a-7 se utilizaron para generar un fragmento de 458 pb que se utilizó para determinar la secuencia 5' del genoma. Para el extremo 3', también se encontró que existe conservación entre los serotipos reportados por lo que se diseñó un oligonucleótido (AstMdT) que contenía las dos últimas bases de la región no traducida del extremo 3' que también son conservadas entre las tres cepas de los diferentes serotipos de astrovirus reportadas. Los oligonucleótidos AstBeg y AstMdT se utilizaron

para generar un fragmento de 322 pb que se utilizaron para determinar la secuencia del extremo 3' del genoma. (Figura 5.1). Posteriormente todos los fragmentos de DNA amplificados fueron secuenciados con un secuenciador automático ABI Prism, modelo 377-18 (Perkin Elmer), utilizando los oligonucleótidos utilizados para generar los fragmentos por PCR y otros descritos en la Tabla 4.1.4

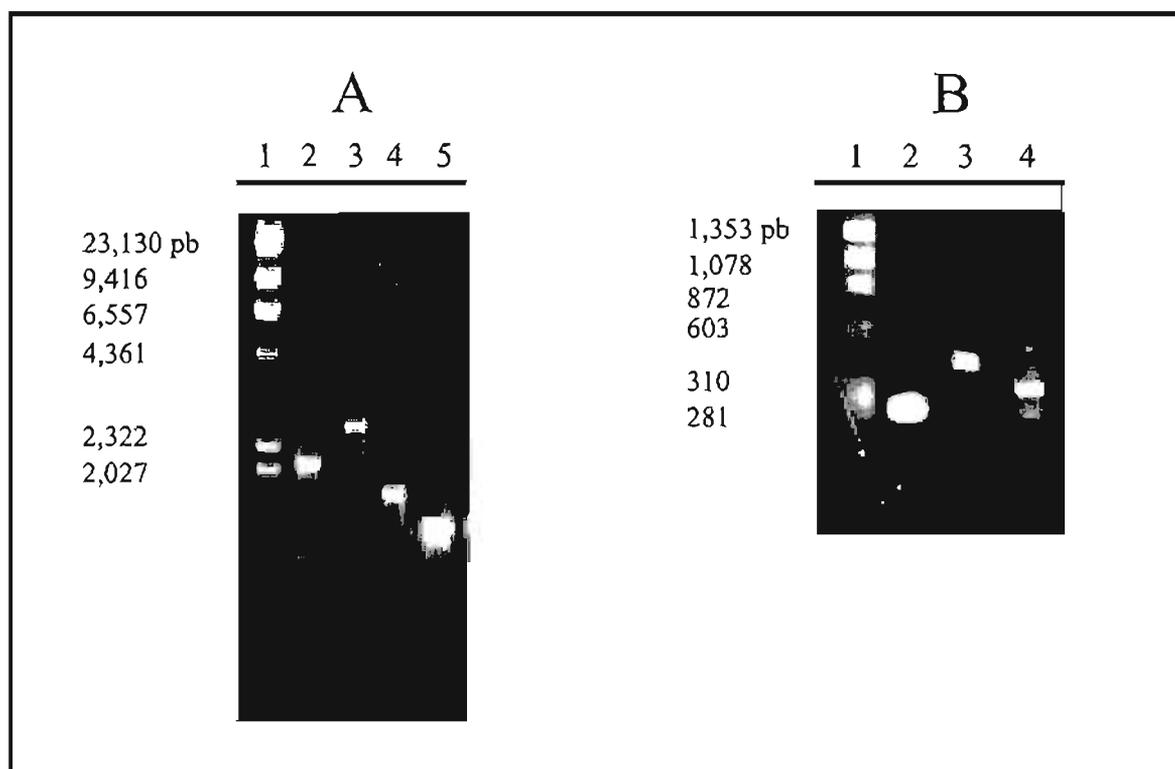


Figura 1.- Fragmentos de Yuc-8 amplificados por RT-PCR usando diferentes pares de oligonucleótidos. En el gel A: 1) marcador molecular, 2) H-Ast 2392-409/Ast1 Nsb, 3) Orf1a-1/H-Ast 2839-22, 4) Orf1a-1/Orf1a-2, 5) Orf1a-3/H-Ast 2839-22. Gel B: 1) marcador molecular, 2) Ast Mon 269/Ast Mon270, 3) Ast1-20/Orf1a-7, 4) Ast Beg/AstMdT

5.1.2.- Construcciones en el plasmido pRS2

Al conocer la secuencia de los fragmentos de RT-PCR, dedujimos sitios de restricción que fueron útiles para clonar estos productos en el vector pRS2 que tiene múltiples sitios únicos de clonación. De esta manera se obtuvieron siete construcciones que abarcaban diferentes regiones de ORF1a y ORF1b, las cuales se utilizaron para obtener una construcción que abarcara ambos marcos de lectura y así se obtuvo la clona pRS2 Yuc-8 (85-3862) (Figura 5.2). La idea en un futuro es mantener en una construcción el genoma completo de Yuc-8. Cabe mencionar que la caracterización de la región de ORF2 fue hecha paralelamente por la estudiante de doctorado Martha Méndez Toss.

5.1.3.- Organización genómica de Yuc-8

Al analizar la secuencia completa del cDNA genómico de Yuc-8 (Gene Bank No. acceso AF260508), observamos que contiene 6759 bases seguido por una región poli (A). El genoma está organizado en tres ORF (1a, 1b y 2) que pueden codificar para proteínas de 103KD, 60KD y 85.6KD, respectivamente; tiene una RNT 5' y una RNT 3' de 83 y 85 nucleótidos, respectivamente. Los motivos de proteasa de serina, señal de localización nuclear, RNA polimerasa dependiente de RNA y señal de ribosomal frameshifting previamente descritos para el genoma de otros astrovirus están totalmente conservados en el genoma de Yuc-8 (Figura 5.3).

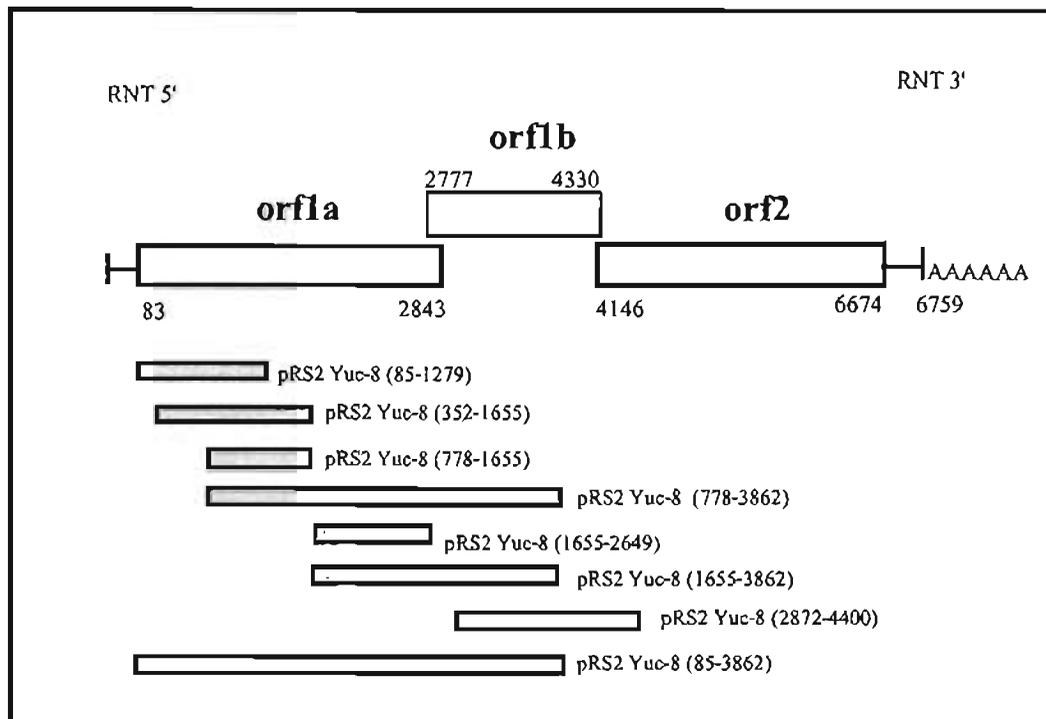


Figura 5.2. Construcciones en el plásmido pRS2 con diferentes insertos de la región no estructural de Yuc-8. Los números entre paréntesis indican la posición en el genoma

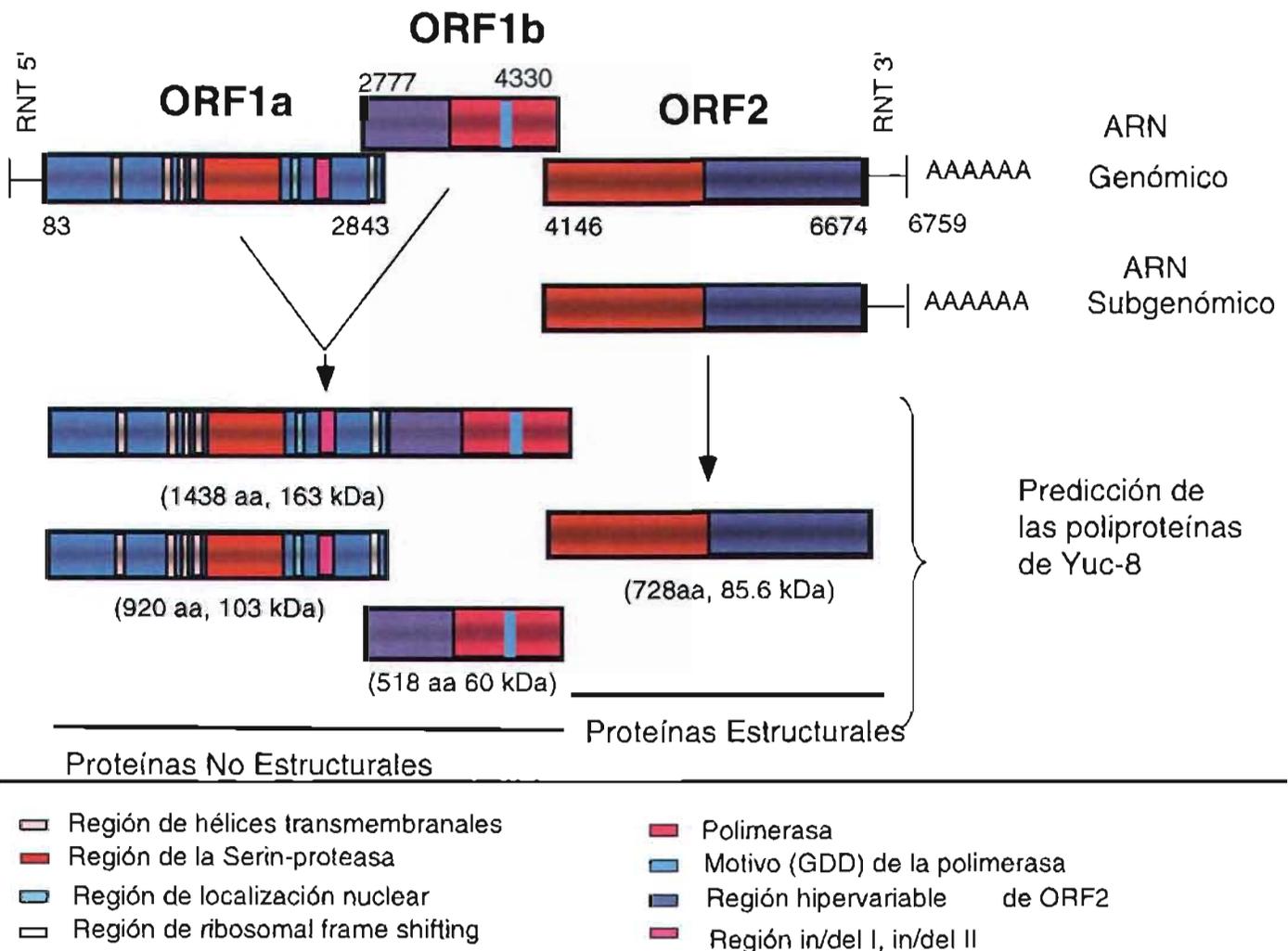


Figura 5.3: Organización genómica de Yuc-8 (Gene Bank No. de acceso AF260508). Se representa gráficamente los tres ORF's y la predicción de la poliproteína estructural. En código de colores se representan los motivos característicos del virus.

5.1.4.- Comparación de Yuc-8 con otros serotipos de astrovirus de humano

La comparación de la región no estructural (ORF1a y 1b) de Yuc-8 con tres secuencias de astrovirus de otros serotipos (HastV-1-3) presentaron una alta homología (más del 93% de identidad a nivel de aa), las diferencias observadas entre ellos se consideraron cambios puntuales ya que estaban distribuidas a lo largo de toda la secuencia (Tabla 5.1). La única diferencia notable observada entre ellas fue una pequeña región altamente variable entre los aminoácidos 767 y 790 de ORF1a, donde dos bloques de 7 y 15 residuos están ausentes en Yuc-8 y H-Ast2 cuando se compararon con HastV-3 y HastV-1, respectivamente (Figura 5.4 in/del I e in/del II, respectivamente). La ausencia de 15 aa en la posición 790 (región in/del II) ha sido asociada con la adaptación de astrovirus a crecer en células HEK y LLCMK₂, pero no en células CaCo-2. Yuc-8 carece de esos 15 aminoácidos a pesar de que fue adaptada a crecer en células CaCo-2, lo cual sugiere que la región in/del II seguramente no es el único factor involucrado en la adaptación de astrovirus humano a una línea celular específica.

	ORF1a				ORF1b			
	Yuc-8	HAsTV-1	HAsTV-2	HAsTV-3	Yuc-8	HAsTV-1	HAsTV-2	HAsTV-3
<u>Yuc-8</u>	100 (100)	88.3 (94.7)	93.1 (97)	89.6 (95.8)	100 (100)	92.2 (98.3)	92.9 (97.7)	72.1 (93.2)
HAsTV-1		100 (100)	90.9 (95)	87.8 (93.1)		100 (100)	92.9 (97.7)	81.9 (93.1)
HAsTV-2			100 (100)	89.5 (96)			100 (100)	84.1 (93.4)
HAsTV-3				100 (100)				100 (100)

Tabla 5.1: Porcentaje de identidad y homología de Yuc-8 con la región no estructural del genoma de diferentes serotipos de astrovirus de humano: HAsTV-1 (Gene Bank No. de acceso Z25571), HAsTV-2 (Gene Bank No. de acceso L13745) y HAsTV-3 (Gene Bank No. de acceso AF141381). Los números representan porcentajes de identidad en nucleótidos y entre paréntesis el porcentaje de identidad en aminoácidos de acuerdo al análisis de ClustalW.

Por otro lado el ORF2 de Yuc-8 puede dar lugar a una proteína de 782 aa. Debido a que la secuencia del ORF2 de cepas de los 8 serotipos se conocen, se realizó la comparación de Yuc-8 y todas las secuencias disponibles en el banco de genes. Se observó una clara correlación entre genotipo y serotipo. Entre las cepas de un mismo serotipo, se presentaron porcentajes de identidad en aminoácidos de arriba del 94%, de esta manera observamos que ORF2 de Yuc-8 fue más idéntica (94%) al ORF2 de un aislado de HastV-8 aislado de Reino Unido que con los serotipos 1-6 (entre 69 y 73%) (Tabla 5.2). El alineamiento de la proteína

deducida de la secuencia del ORF2 de Yuc-8 reveló que la poliproteína tiene dos diferentes dominios, los cuales pueden ser distinguidos por su grado de identidad. El dominio NH₂ terminal, que se extiende desde el inicio de la poliproteína hasta el aminoácido 415, está altamente conservado (80% de identidad aa) entre los diferentes serotipos, pero presenta dos regiones variables (V1 y V2) que se localizan entre los aminoácidos 292 a 319 y del 386 al 399, respectivamente. El otro dominio, que incluye la región corriente abajo del aminoácido 415, presentó identidades hasta del 38% (p.ej. comparando entre HAstV-4 y HAstV-6), lo cual pudiera ser indicativo que esta región variable sea el principal determinante de serotipificación. Debido a que el aminoácido Arg361, que había sido reportado como sitio de corte por tripsina para una de las proteínas, VP29, está totalmente conservado entre todos los serotipos analizados, hipotetizamos que el corte en el aminoácido 361 podría ser biológicamente relevante para la producción de VP29 y VP26. Este sitio de corte se encuentra entre los residuos 359 y 365 que es una región totalmente conservada lo cual puede tener un papel estructural para hacer este sitio físicamente accesible al procesamiento.

Serotipo/ Cepa		Porcentaje de Identidad														
		Yuc-8	HAstV-1			HAstV-2			HAstV-3		HAstV-4	HAstV-5	HAstV-6			HAstV-8
			A	B	C	A	B	C	A	B			A	B	C	D
Yuc-8		70.9	70.9	70.8	69.6	69.5	69.6	71.6	72.1	69.2	73.3	72	71.7	71.6	71.7	94
HAstV-1	A	100														
	B	100	100													
	C	97.6	97.3	100												
HAstV-2	A	68.3	68.3	69.3	100											
	B	68.1	68.1	69.1	99.9	100										
	C	68.3	68.3	69.3	100	99.9	100									
HAstV-3	A	75.3	75.3	75.7	71.8	71.7	71.8	100								
	B	75.2	75.2	75.6	71.7	71.6	71.7	98.2	100							
HAstV-4		61.2	61.2	60.7	64.1	64	64.1	59.6	60	100						
HAstV-5		69.3	69.3	69.5	65	64.9	65	70.4	70.4	61.7	100					
HAstV-6	A	70.2	70.2	70.3	65.8	65.7	65.8	70.6	71.9	62.6	74	100				
	B	71.4	71.4	71.4	66.7	66.6	66.7	70.9	72.3	62.6	75.2	95.5	100			
	C	71.3	71.3	71.3	66.6	66.5	66.6	70.8	72.2	62.3	75.1	95.4	99.6	100		
	D	71.4	71.4	71.4	66.7	66.6	66.6	70.9	72.3	62.4	75.2	95.5	99.7	99.9	100	
HAstV-8		68.5	68.5	68.5	67.8	67.6	67.8	69.3	69.4	67.3	70.6	70	70.3	70.3	70.3	100

Tabla 5.2: Homología de aminoácidos de ORF2 de los diferentes serotipos de astrovirus de Humano. Los números están dados en porcentajes de identidad de acuerdo al análisis con ClustalW. Las cepas del mismo serotipo se denominaron A, B, C y D.

5.1.5.-Predicción de estructura y modificaciones postraduccionales en las poliproteínas de Yuc-8

Se determinó la presencia de posibles sitios de modificación postraduccionales en las tres poliproteínas de Yuc-8. La proteína nsP1a cuenta con 4 posibles sitios de N-glicosilación, 5 sitios de fosforilación por proteína cinasa C, 11 sitios de fosforilación por caseína cinasa II, 2 sitios de fosforilación por tirosina cinasa y 7 sitios de N-miristilación. La proteína nsP1b presentó 3 sitios de fosforilación por proteína cinasa C, 4 sitios de fosforilación por caseína cinasa II, 2 sitios de fosforilación por tirosina cinasa y 2 sitios de N-miristilación; finalmente el análisis de la proteína estructural reveló la presencia de 8 sitios de N-glicosilación, 7 sitios de fosforilación por proteína cinasa C, 15 sitios de fosforilación por caseína cinasa II, 3 sitios de fosforilación por tirosina cinasa y 2 sitios de N-miristilación. Es de interés este tipo de información para poder dar una posible explicación a la variación de los pesos moleculares de las proteínas reconocidas por los sueros anti Yuc-8 así como de la funcionalidad de las mismas en una infección natural. Por otro lado se predijo la estructura secundaria de las proteínas nsP1a y nsP1b, lo cual reveló la presencia de estructura del tipo de alfa hélices y cadenas extendidas, por otro lado la porción de residuos de aminoácidos a la cual no fue asignada una determinada estructura secundaria se sugiere que son porciones que le dan flexibilidad estructural a la proteína (Figura 5.5).

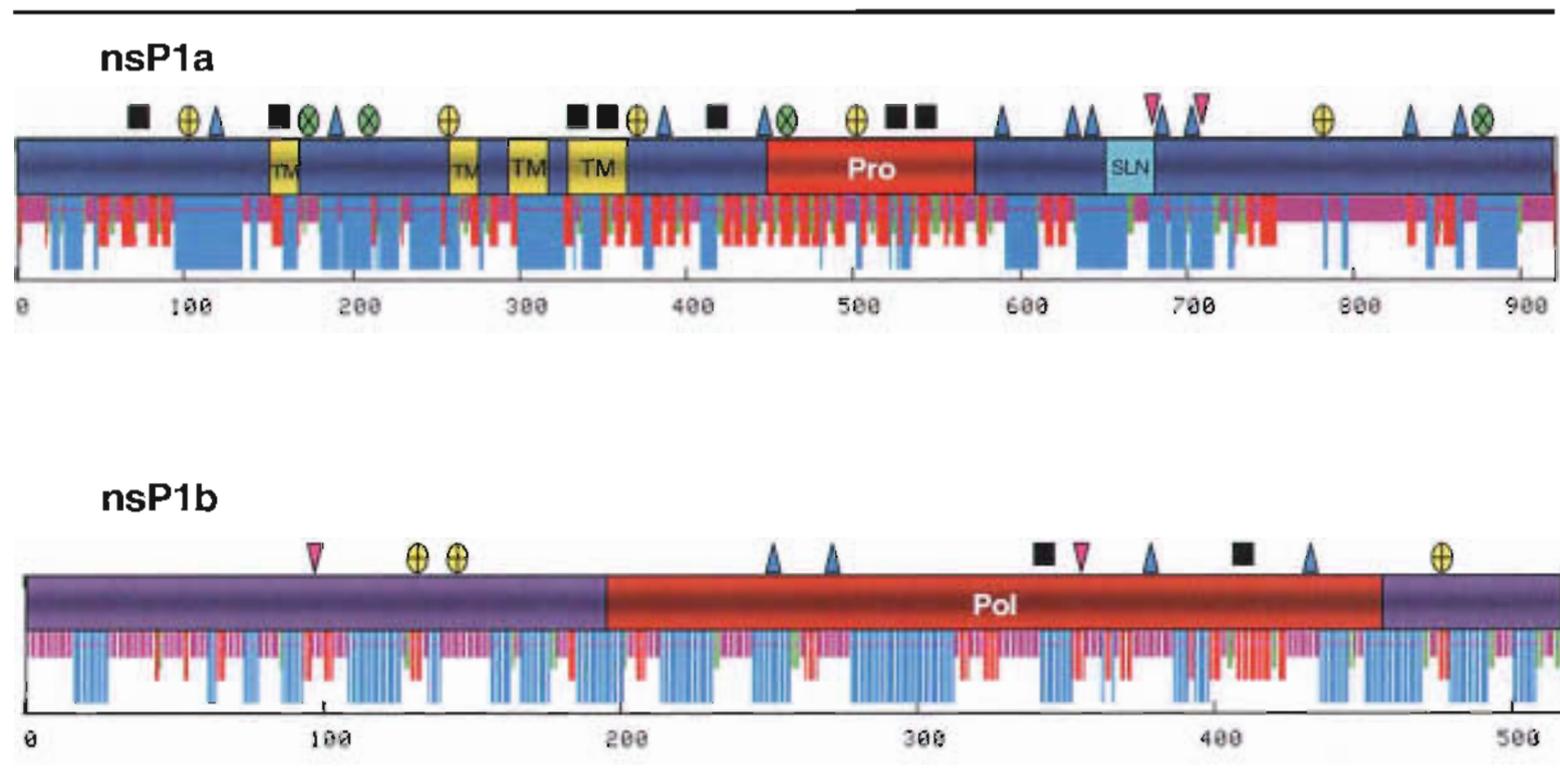


Figura 5.5: Predicción de estructura secundaria y modificaciones postraduccionales en las proteínas nsP1a y nsP1b. La predicción de estructura secundaria se determinó con el método SOPMA y las modificaciones postraduccionales que se muestran son el resultado consenso entre los tres serotipos de astrovirus de humano (HAstV-1 Gene Bank No. de acceso Z25571, HAstV-2 Gene Bank No. de Acceso L13745 y HAstV-3 Gene Bank No. de Acceso AF141381) y Yuc-8. La escala representa el número de aminoácidos y la posición relativa de los motivos representativos de cada proteína.

Simbología:

- | | |
|--------------------|--------------------------------|
| Alfa hélices | N-glicosilación |
| Cadenas extendidas | Fosforilación protein cinasa C |
| Beta turn | Fosforilación casein cinasa II |
| Loop expuesto | Fosforilación tirosin cinasa |
| | N-miristilación |

5.1.6.- Obtención de proteínas de fusión y sueros hiperinmunes

A partir de las clonas de cDNA de Yuc-8 producidas previamente en el vector pRS2 (Figura 5.2), se clonaron distintos fragmentos del ORF1a y ORF1b en los vectores de expresión procariota pET28b, generando proteínas de fusión a residuos de histidina, y pGEX-4T-3, que genera proteínas de fusión a GST (Figura 5.6). Estas proteínas recombinantes sirvieron para producir antisueros que se utilizaron en la identificación de las proteínas procesadas de la región no estructural. La estrategia a seguir fue utilizar los diversos antisueros producidos para identificar los productos del procesamiento de la poliproteína nsP1a-nsP1b a través de un sistema de expresión eucariontica de células infectadas con Yuc-8.

Estas proteínas fueron obtenidas por M:C María Elena Munguía, M.C. Martha Méndez Toss y el Dr. Ernesto Méndez Salinas quienes también participaban en el proyecto. En lo particular, obtuve la proteína denominada 1a-1 (Fig. 5.6) en la clona pET28b1a, que incluye los residuos 41-257 de nsP1a. La proteína 1a-1 se produjo como una proteína de fusión a residuos de histidina con un peso molecular aproximado de 30 KD. Esta proteína se purificó a partir de geles preparativos al 15% utilizando un lisado de bacterias JM101 inducidas con 1mM de IPTG (materiales y métodos). La identidad de la proteína se confirmó por western blot (Figura 5.7) con el lisado de un cultivo de bacteria con y sin inducir con IPTG y utilizando el suero que se había preparado contra el péptido KAN, que incluye los residuos 108-124 de nsP1a (Tabla 5.3).

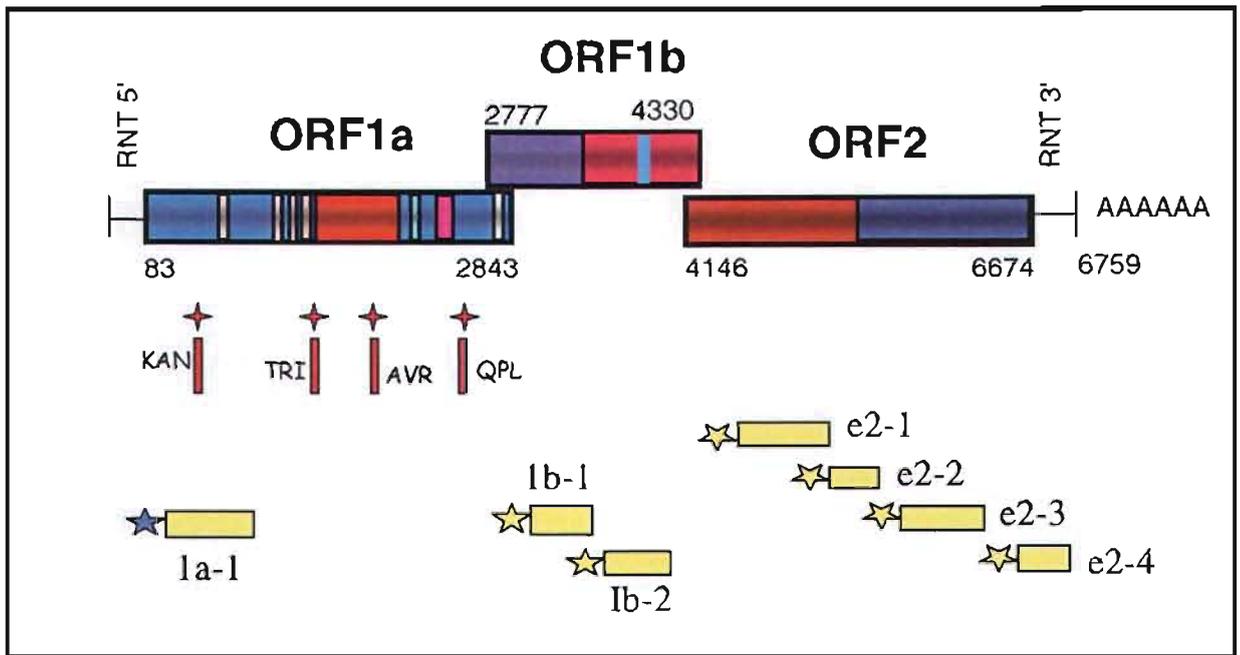


Figura 5.6: Regiones de Yuc-8 clonadas en vectores de expresión para generar proteínas de fusión. Los números representan residuos de aminoácidos.

- ✦ Representan péptidos sintéticos acoplados a KLH.
- ☆ Representan proteínas de fusión a GST
- ★ Representan proteínas de fusión a residuos de Histidina

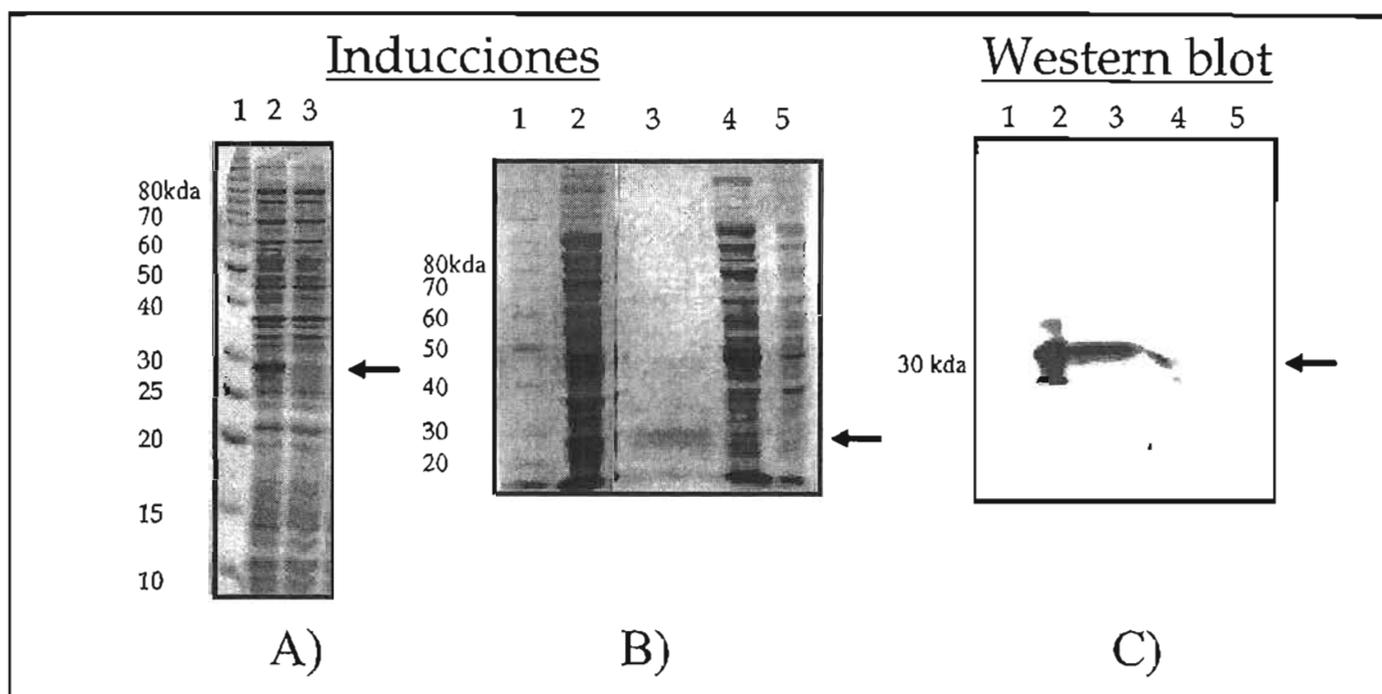


Figura 5.7: Presenta la inducción de la clona pET28bYuc-8Orf1a(41-257).

Gel A: 1) marcador molecular, 2) pET28bYuc-8Orf1a(41-257) inducida con IPTG, 3) pET28bYuc-8Orf1a(41-257) sin IPTG. Gel B: 1) marcador molecular, 2) Pastilla de pET28bYuc-8Orf1a(41-257) con IPTG, 3) Proteína electroeluida de pET28bYuc-8Orf1a(41-257), 4) Sobrenadante de pET28bYuc-8Orf1a(41-257) con IPTG y 5) Pastilla de pET28bYuc-8Orf1a(41-257) sin IPTG. El panel C representa una autoradlografía de western blot usando el antipéptido KAN: 1) marcador molecular, 2) Pastilla de pET28bYuc-8Orf1a(41-257) con IPTG, 3) Proteína electroeluida de pET28bYuc-8Orf1a(41-257), 4) Sobrenadante de pET28bYuc8Orf1a (41-257) con IPTG y 5) Pastilla de pET28bYuc-8Orf1a(41-257) sin IPTG.

La proteína 1a-1 se inoculó a un conejo y el suero se recuperó después de cuatro inoculaciones. Los sueros mencionados en la tabla 5.3, que fueron utilizados en experimentos posteriores se obtuvieron de una manera similar por otras personas en el laboratorio. La secuencia de los péptidos sintéticos, mencionados en la tabla 5.3, y utilizados para producir sueros se diseñaron con base a la secuencia del virus serotipo 1 (gene bank No. de acceso Z25771), ya que la identidad a nivel de secuencia de aminoácidos entre los genomas de los tres serotipos (HAstV-1, 2 y 3) disponibles en el banco de genes es muy alta. Se seleccionaron regiones totalmente conservadas que estaban distribuidas a lo largo de la secuencia del ORF1a como se muestra en la Figura 5.6. Los nombres de estos péptidos corresponden a la abreviatura

de los tres primeros aminoácidos de la secuencia que los conforma. Estos péptidos fueron sintetizados por la compañía Research Genetics Co. (USA), y fueron acoplados a KLH en nuestro laboratorio. Aproximadamente 100µg de cada péptido fueron inoculados en la línea de ratón BALBc y el suero se colectó después de cuatro inoculaciones a intervalos de dos semanas.

Plasmido	ORF	Nombre de la Proteína/péptido	Especie
pET28b ORF1a (41-257)	1a	1a-1	conejo
pGEX ORF1b (33-171)	1b	1b-1	conejo
pGEX ORF1b (201-361)	1b	1b-2	conejo
pGEX ORF2 (3-208)	2	e2-1	conejo
pGEX ORF2 (209-341)	2	e2-2	conejo
pGEX ORF2 (386-594)	2	e2-3	conejo
pGEX ORF2 (655-782)	2	e2-4	conejo
Péptidos sintéticos			
antipéptido KAN (108-124) (KANALQERLRLRSQEEKA)	1a	KAN	ratón
antipéptido TRI (404-420) (TRIKNVAFDFQKLIKQS)	1a	ITR	ratón
antipéptido AVR (543-556) (AVRTQDGMSGAPVC)	1a	AVR	ratón
antipéptido QPL (778-795) (QPLDLSQKKEKQPEHEQQ)	1a	QPL	ratón

Tabla 5.3: Anticuerpos producidos contra diferentes regiones de ORF1a, ORF1b y ORF2. Los nombres pET28b y pGEX corresponden a los vectores usados para la expresión y los números entre paréntesis indican los aminoácidos que comprenden en su respectivo ORF.

5.1.7.- Reactividad de sueros hiperinmunes contra proteínas de Yuc-8

Para evaluar la reactividad de los sueros, producidos contra los péptidos y las proteínas recombinantes, realizamos dos tipos de ensayos: inmunofluorescencia de células CaCo2 infectadas con Yuc-8, lo cual nos indicaría al mismo tiempo la localización celular de las proteínas reconocidas por los sueros; e inmunoprecipitación de proteínas de astrovirus expresadas transitoriamente en un sistema de expresión eucarionta a partir de clonas de cDNA que expresan nsP1a y nsP1b bajo el promotor de la RNA polimerasa del fago T7 y cuya traducción depende de un elemento IRES (Figura 5.8). Estas clonas de cDNA fueron producidas por M.C. María Elena Munguía y el Dr. Ernesto Méndez Salinas, utilizando las clonas señaladas en la Figura 5.2, como punto de partida.

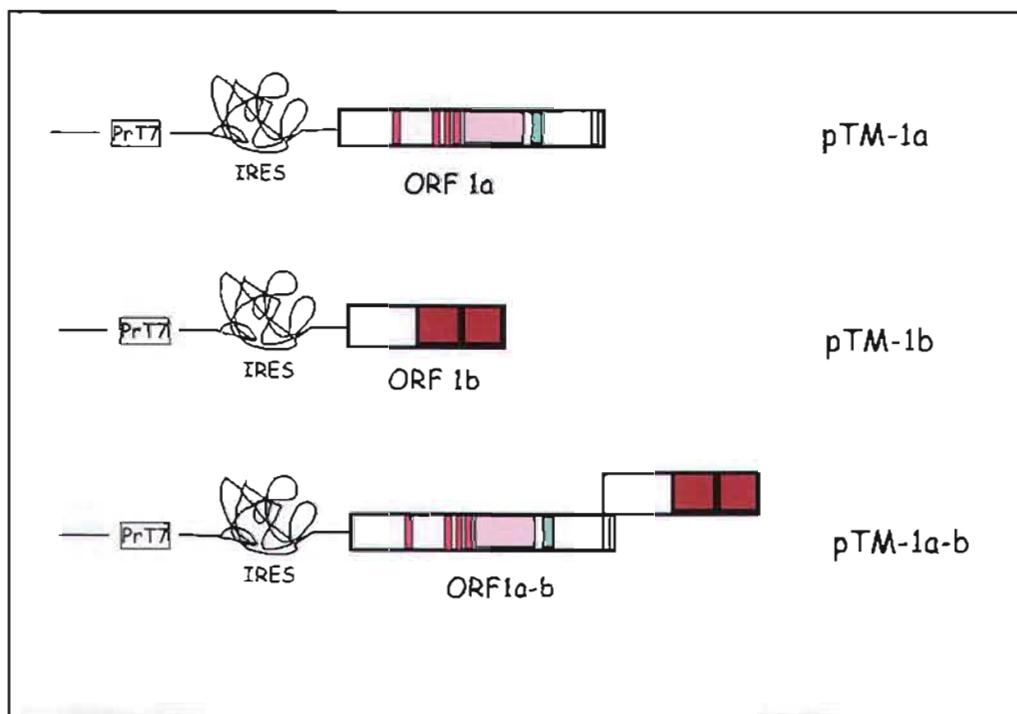


Figura 5.8: Construcciones de la región no estructural de Yuc-8 en el vector pTM1 empleadas en ensayos de expresión transitoria. PrT7- Promotor de la T7 RNA polimerasa, IRES: sitio interno de entrada al ribosoma

Utilizando el plasmido pTM-1a con experimentos de expresión transitoria, no se detectó alguna proteína sobre expresada, sin embargo se detectaron proteínas marcadas con ^{35}S Met y con ^{35}S Cys de 18 y 23 KD cuando se inmunoprecipitó con el suero anti 1a-1 (Figura 5.9 (C)). La proteína derivada del plasmido pTM1b se observó como una proteína marcada con ^{35}S Met y con ^{35}S Cys de aproximadamente 59 kD, la cual fue inmunoprecipitada con los sueros 1b-1 y 1b-2. De manera adicional, el suero 1b-1 inmunoprecipitó otra proteína de 34 KD, de la cual no se sabe su identidad (Figura 5.9 (B)).

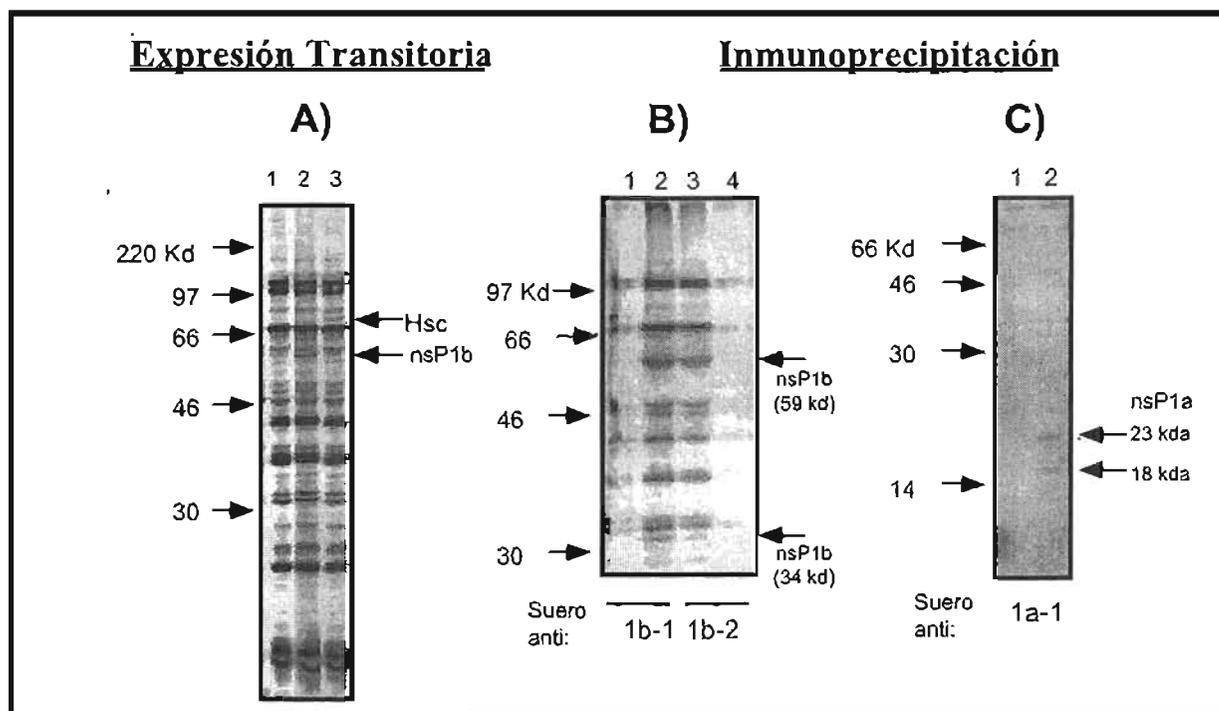


Figura 5.9: Expresión transitoria e inmunoprecipitación de las proteínas nsP1a y nsP1b. Expresión Transitoria gel A: 1) Plasmido pTM1 (control negativo), 2) Plasmido pTM-1b, que expresa la proteína nsP1b, 3) Plasmido pcDNA-Hsp, que expresa a la proteína HSC70 utilizada como control positivo. Inmunoprecipitación gel B: 1) Proteínas expresadas del plasmido pTM1 e ipp con el suero 1b-1, 2) Proteína nsP1b expresada del plasmido pTM-1b e ipp con el suero 1b-1, 3) Proteína nsP1b expresada del plasmido pTM-1b e ipp con el suero 1b-2, 4) Proteínas expresadas del plasmido pTM1 e ipp con el suero 1b-2. Gel C: 1) Proteínas expresadas del plasmido pTM1 e ipp con el suero 1a-1, 2) Proteínas nsP1a expresadas del plasmido pTM-1a e ipp con el suero 1a-1. Se indican los pesos moleculares a la izquierda de cada gel y las flechas del extremo derecho del gel señalan las proteínas expresadas e ipp de Yuc-8, así como la proteína HSC70, que fue utilizada como control de expresión.

Por otro lado se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para determinar la distribución de las proteínas virales en células infectadas con Yuc-8. Se utilizaron los sueros producidos contra las proteínas recombinantes y contra péptidos sintéticos señalados en la figura 5.6 que incluían parte de la poliproteína no estructural y casi la totalidad de la región estructural. Así, se encontró que todos los sueros reconocen estructuras con una distribución perinuclear, pero ninguno de ellos reconoció antígeno viral dentro del núcleo. De esta manera, se podría pensar que la replicación de astrovirus es citoplásmica y que la señal de localización nuclear presente en nsP1a podría no ser funcional para dirigir proteínas virales al núcleo. En particular, cuando se usó el suero 1b-1 se observó una tinción muy intensa en el área perinuclear. Este suero reconoce el producto del ORF1b, es decir a la RNA polimerasa dependiente de RNA y no sería raro encontrar los productos de esta proteína asociados al retículo endoplásmico donde se podrían estar sintetizando los RNAs mensajeros virales para su traducción (Figura 5.10 y 5.11).

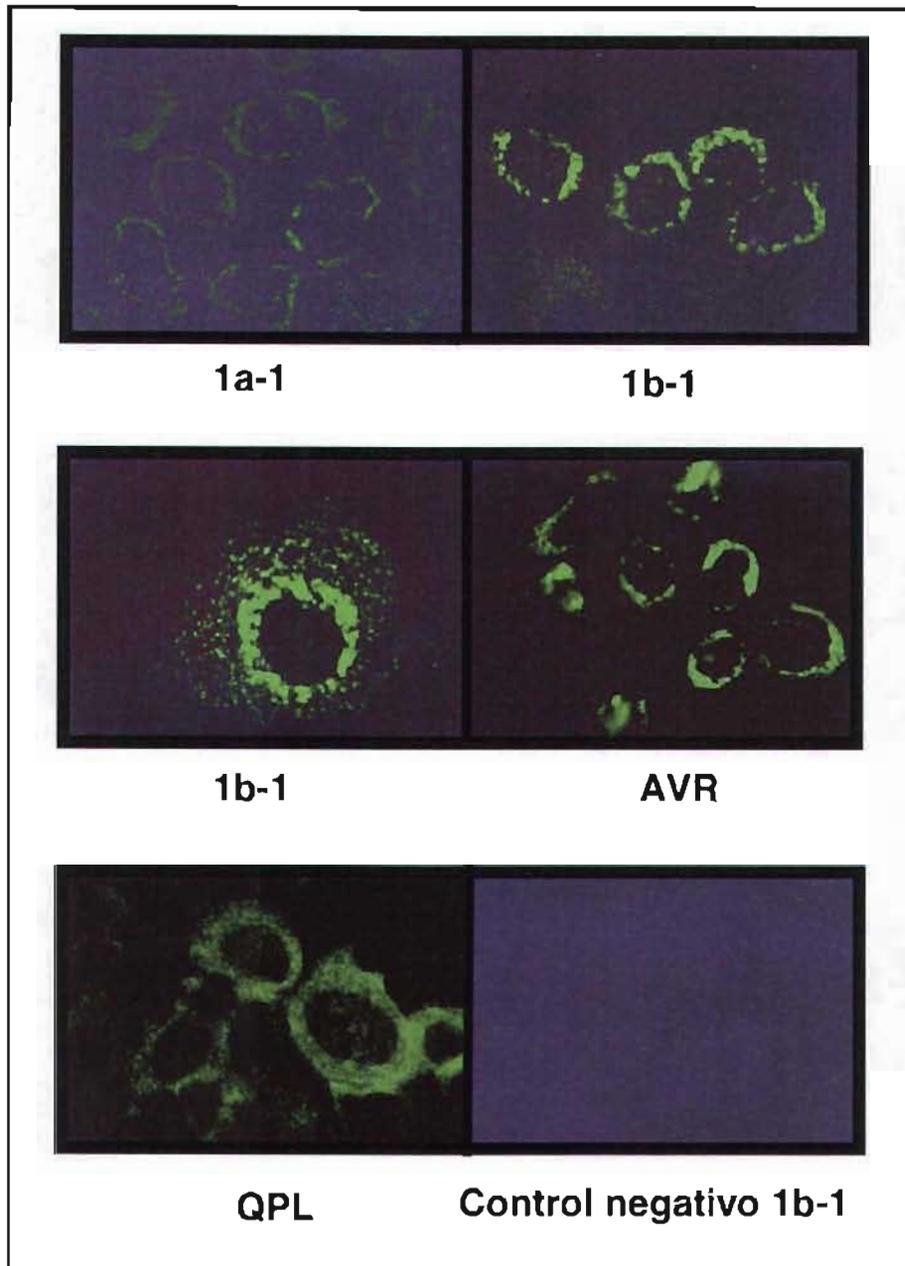


Figura 5.10: Inmunofluorescencia de células CaCo2 infectadas con Yuc-8 utilizando sueros dirigidos contra proteínas y péptidos derivados del ORF1a y ORF1b como anticuerpo primario. El control negativo son células CaCo2 no infectadas.

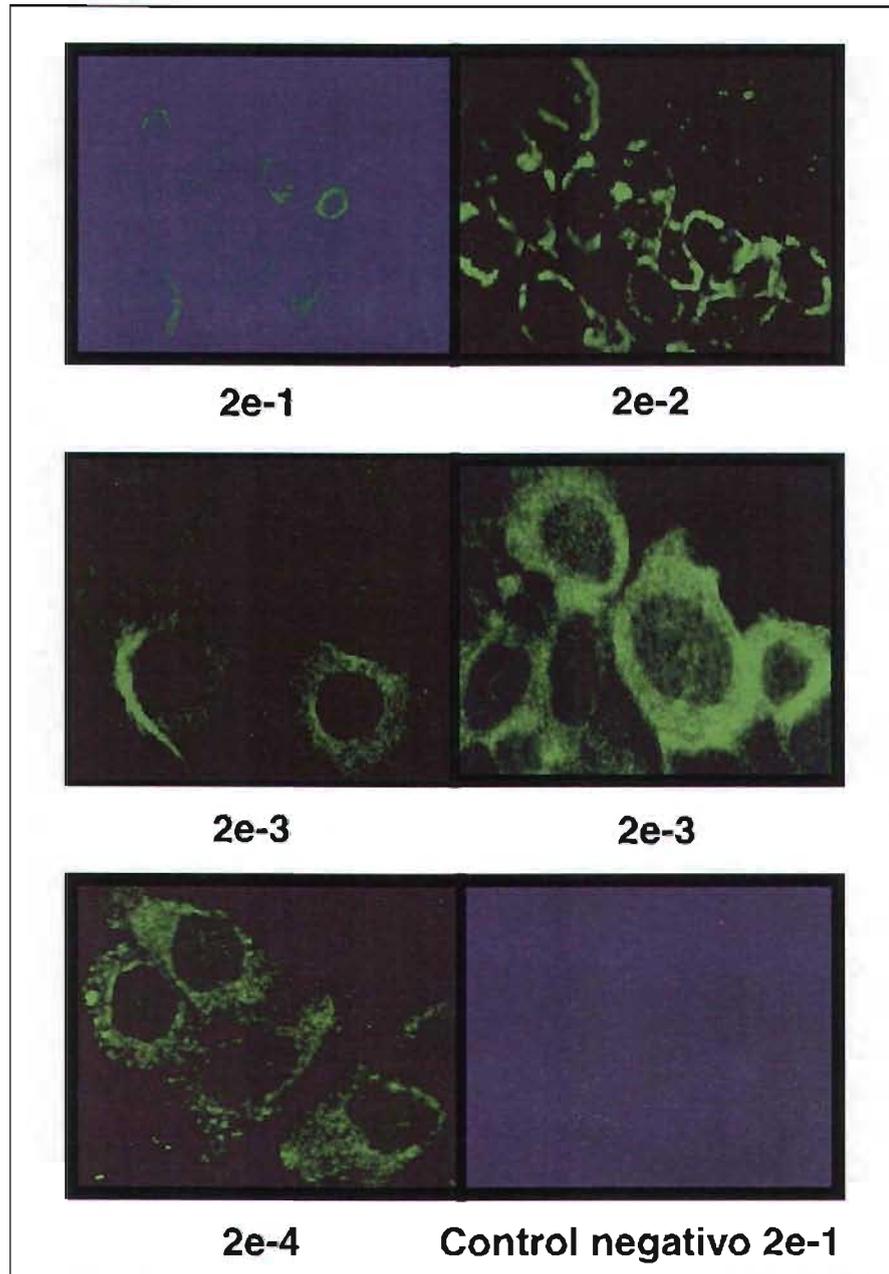


Figura 5.11: Inmunofluorescencia de células CaCo2 infectadas con Yuc-8 utilizando los sueros dirigidos contra proteínas derivadas del ORF2 como anticuerpo primario. El control negativo son células CaCo2 no infectadas.

6.1.- Discusión

En nuestro laboratorio se ha trabajado con la cepa Yuc-8 de HasV como modelo para el estudio de distintos aspectos de la biología de los astrovirus. Esta cepa proviene de una muestra de heces de un niño con diarrea y pertenece a un serotipo que hasta la fecha se ha reportado como poco frecuente. Es de interés hacer notar que la infección por astrovirus provoca diarreas leves, por lo cual no ha sido profundamente estudiado; sin embargo, la presencia del astrovirus en patrones estacionales en humanos, tal como ocurre con otros virus como los rotavirus, lo hace un modelo de importancia para el diseño de medidas de prevención hacia las infecciones gastrointestinales.

Hasta hace poco tiempo los métodos de diagnóstico no habían sido suficientemente desarrollados para su uso de rutina. Sin embargo, recientemente se han desarrollado métodos tan sensibles como RT-PCR que pueden practicarse en cualquier laboratorio especializado. Utilizando esta metodología en estudios epidemiológicos sobre los agentes causantes de infecciones gastrointestinales se ha encontrado que los astrovirus ocupan el segundo lugar entre los agentes virales causantes de gastroenteritis, después de los rotavirus.

Este trabajo tuvo su raíz en un estudio de epidemiología molecular realizado en México, en el cual se logró adaptar una cepa de astrovirus humano, Yuc-8, a crecer en una línea celular derivada de carcinoma de colon humano (CaCo2).

En nuestro laboratorio se ha determinado la secuencia nucleotídica del genoma de la cepa Yuc-8 de astrovirus, lo cual tiene como relevancia que es la cuarta secuencia completa de

astrovirus humanos reportada; además de ser la primera secuencia de una cepa de serotipo 8. El análisis de su genoma fue reportado por Mendez-Toss et al (2000), a partir del cual se han desarrollado diversas estrategias para estudiar la biología molecular del astrovirus.

Yuc-8 es una cepa importante debido a que el serotipo al que pertenece se había reportado como poco frecuente en el mundo. La manera en que se determinó el serotipo de Yuc-8 fue a través de un análisis comparativo de la secuencia del ORF2 de Yuc-8 con secuencias del ORF2 de otros serotipos disponibles en el banco de genes, entre los que se encontró una clara correlación entre serotipo y genotipo. Las cepas pertenecientes al mismo serotipo presentaron identidades superiores al 94%. A pesar de no haber estudios serológicos, consideramos que Yuc-8 pertenecía al serotipo 8 debido a que estuvo muy relacionado con una cepa de serotipo 8 aislada en el Reino Unido, mostrando 94% de identidad. Con los serotipos restantes (1-6) mostró porcentajes de identidad que oscilaban entre el 69 y 73%.

La región de las proteínas no estructurales de Yuc-8, presentaron altos niveles de conservación (superiores al 93% de identidad a nivel de aminoácidos) con la secuencia correspondiente de los tres serotipos reportados (HAstV-1, 2 y 3). Estos resultados apoyan la idea de que las secuencias de las proteínas encargadas de la replicación viral se mantienen bastante conservadas entre virus de una misma familia, así como entre las diferentes familias de virus de RNA de cadena sencilla polaridad positiva. Este aspecto se torna interesante debido a que surge la pregunta obligada sobre ¿cómo fue el origen evolutivo de estos virus? Aún no está claro si partieron de un mismo ancestro común, si aprovecharon ventajosamente su elevada tasa mutacional, tal vez por presión selectiva, permitiéndoles la especialización para infectar diferentes tejidos celulares y ocasionar tan diversas enfermedades en los mamíferos.

En la actualidad el uso de herramientas bioinformáticas para el estudio de modelos biológicos ha tomado gran importancia debido al fácil acceso y manejo de la información. En nuestro caso, al comparar Yuc-8 con otras cepas, se detectó una deleción de 7 y 15 aminoácidos en una pequeña región de alta variabilidad que fue encontrada entre los aminoácidos 767 y 790 del ORF1a (de acuerdo a la numeración de la secuencia de Yuc-8). Esta región había sido correlacionada con la adaptación de astrovirus al cultivo en las líneas celulares HEK y LLCMK2, ya que en estas células pero no en las células Caco2, se observaban tales deleciones. Sin embargo, nuestros resultados no parecen coincidir con esta observación, ya que Yuc-8 fue crecida en células Caco2 y carece de esos 15 aminoácidos, por lo que no se sabe si la región hipervariable donde se encuentran estas deleciones tiene alguna función en la replicación o adaptación del virus. Para analizar esta posibilidad se tendría que secuenciar esta región a partir de la síntesis de cDNA usando como templado RNA viral extraído de la muestra de heces de la que fue aislada Yuc-8. En el caso de que esta región estuviera presente en la cepa antes de la adaptación al cultivo celular, se tendrían que analizar los diferentes pasos por los que el virus pasó en su proceso de adaptación al cultivo celular y determinar en que momento se perdió y cual es su posible función.

Por otro lado, la presencia de una señal de localización nuclear en un virus de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva como astrovirus es inusual, ya que estos virus generalmente se replican en citoplasma. El hecho de que esta señal sea funcional experimentalmente y dirija a la proteína GFP al núcleo celular, genera preguntas acerca de su participación en el ciclo replicativo de los astrovirus. Como se describió en los resultados de inmunofluorescencia, no se detectaron proteínas virales en el núcleo de las células infectadas con Yuc-8; sin embargo esto no descarta la participación de este organelo en el ciclo replicativo viral. Consideramos que el estudio sobre la posible función de la señal de localización nuclear en

el ciclo replicativo de astrovirus Yuc-8, deberá generar conocimiento sobre la biología de estos virus.

A pesar de que se han identificado diversos motivos característicos de proteínas no estructurales en la secuencia del astrovirus, aun no se ha confirmado su actividad como tales. El hecho de que en los astrovirus no se hayan identificado los motivos que codifican para proteínas esenciales en la replicación de los virus de RNA, tales como RNA helicasa, metil transferasa y/o Vpg, no significa que estas funciones no existan. De esta manera, se requieren estudios más detallados para conocer la forma en que los astrovirus llevan a cabo estas funciones y que parte del genoma es responsable de tales funciones. Existe la posibilidad de que astrovirus codifique para proteínas con funciones similares, pero con secuencias parcialmente diferentes, lo cual ha dificultado la identificación de tales motivos en su genoma.

Otro punto relevante de este trabajo ha sido la generación de clones de cDNA con secuencias que representan diferentes regiones del genoma de astrovirus, las cuales pueden ser de utilidad para la generación de una clona infecciosa que podría servir como vector de expresión de proteínas heterologas. Así, como vector, astrovirus podría utilizarse en la prevención de infecciones por patógenos gastrointestinales. Estos plasmidos han sido útiles para la expresión de proteínas recombinantes en bacteria, las cuales se han utilizado en la generación de anticuerpos policlonales. Estos anticuerpos están siendo utilizados para estudiar las proteínas resultantes del procesamiento y su función dentro del ciclo replicativo de astrovirus.

En base al estudio de los productos de la región no estructural realizado por varios autores (Gibson y col, 1998; Willcocks y col., 1999; Geigenmüller y col., 2002a; Kiang y Matsui, 2002; y Méndez y col.; 2003) se sugiere la existencia de al menos cinco proteínas derivadas de

nsP1a como productos finales del procesamiento: nsP1a/1 (18-20 kD), nsP1a/3 (27-28 kD), nsP1a/4 (24-26 kD) y dos proteínas de 6.5 y 5.5 kD. El producto entre nsP1a/1 y nsP1a/3 no se ha identificado pero tendría un peso molecular aproximado de 28 kD (nsP1a/2?). Con respecto al procesamiento de la poliproteína nsP1a de Yuc-8, logramos identificar dos proteínas, una de 18 y otra de 23 kD, cuando se inmunoprecipitó con el suero anti 1a-1. Este suero reconoce productos que se localizan hacia el amino terminal de la nsP1a y según el modelo de los autores antes mencionados, la proteína de 18 kD que nosotros identificamos correspondería a lo que ellos reportan como nsP1a/1. Por otro lado, en el modelo que ellos proponen, no identificaron el posible producto nsP1a/2 y no determinaron su posible peso molecular. Nosotros logramos inmunoprecipitar con el suero anti 1a-1 una proteína de aproximadamente 23 kD, la cual pudiera corresponder al producto nsP1a/2 o bien al producto de 18 kD con modificaciones postraduccionales tales como la glicosilación.

Por otro lado, utilizando los sueros anti 1b-1 y 1b-2 con proteínas obtenidas por expresión transitoria, logramos inmunoprecipitar una proteína de aproximadamente 59 kD, que corresponde al producto nsP1b, que deriva del procesamiento de nsP1ab de Yuc-8. Sin embargo, también se inmunoprecipitó otra proteína de aproximadamente 34 kD la cual se desconoce su identidad y también es expresada en células infectadas con Yuc-8, no solo en experimentos de expresión transitoria.

Finalmente por ensayos de inmunofluorescencia, usando anti sueros y anti péptidos que reconocen proteínas virales en células infectadas con Yuc-8, se observó que las proteínas virales se distribuyen de manera citoplásmica en la célula, específicamente alrededor del núcleo, lo cual fue más evidente al usar el anti suero 1b-1 el cual detecta el producto de la RNA

polimerasa dependiente de Sabemos que la replicación de los virus de RNA se lleva acabo asociada a membrana en el citoplasma y por lo que no sería sorprendente encontrar proteínas de astrovirus asociadas al retículo endoplásmico. Para conocer la distribución de las proteínas virales en células infectadas, podrían realizarse ensayos de inmunofluorescencia con sueros específicos de Yuc-8 en combinación con sueros específicos de organelos celulares que sirvan como marcadores.

7.1.- Conclusiones

- El análisis computacional de la secuencia genómica de Yuc-8 y su comparación con otras cepas de astrovirus ha contribuido para un entendimiento de los dominios conservados y los dominios variables de los astrovirus. En base a este análisis, se han diseñado estrategias y han surgido proyectos de investigación enfocados al estudio de diversos aspectos de la biología de estos virus causantes de gastroenteritis.

- Se generaron sueros contra péptidos sintéticos y contra proteínas recombinantes producidas en bacteria y expresadas de manera transitoria, los cuales se han utilizado para estudiar el procesamiento de las poliproteínas virales, así como su localización en células infectadas con astrovirus por inmunofluorescencia.

- Se identificaron dos proteínas derivadas del extremo amino de nsP1a, de aproximadamente 18 y 23 kD y, una proteína que se piensa que es el producto final del procesamiento de la proteína nsP1b, de 59 kD, y que parece representar a la RNA polimerasa del virus.

- Por Inmunofluorescencia de células infectadas con Yuc-8, se determinó que las proteínas virales se localizan en el citoplasma, específicamente en un área perinuclear, lo que parece confirmar que la replicación del virus es citoplásmica.

8.1.- Bibliografía

A

Abad, F. X., R. M. Pintó, C. Villena, R. Gajardo, & A. Bosch. 1997. Astrovirus survival in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3119-3122.

Abad, F. X., C. Villena, S. Guix, S. Caballero, R. M. Pintó, & A. Bosch. 2001. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 3904-3907.

Albert L. Lehninger. 1993. Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular. Ediciones Omega. Barcelona

Appleton, H. & P. G. Higgins. 1975. Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* 1: 1297.

Ashley, C. R. & E. O. Caul. 1982. Potassium tartrate-glycerol as a density gradient substrate for separation of small, round viruses from human faeces. *J. Clin. Microbiol.* 16: 377-381.

B

Bass, D. M. & U. Upadhyayula. 1997. Characterization of human serotype 1 astrovirus neutralizing epitopes. *J. Virol.* 71: 8666-8671.

Bass, D. M. & S. Qiu. 2000. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *J. Virol.* 74: 1810-1814.

Belliot, G., H. Laveran, & S. S. Monroe. 1997a. Capsid protein composition of reference strains and wild isolates of human astroviruses. *Virus Res.* 49: 49-57.

Belliot, G., H. Laveran, & S. S. Monroe. 1997b. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *J. Med. Virol.* 51: 101-106.

Belliot, G., H. Laveran, & S. S. Monroe. 1997c. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch. Virol.* 142: 1323-1334.

Björkholm, M., F. Celsing, G. Runarsson, & J. Waldenström. 1995. Successful intravenous immunoglobulin therapy for severe and persistent astrovirus gastroenteritis after fludarabine treatment in a patient with Waldenström's macroglobulinemia. *Int. J. Hematol.* 62: 117-120.

Bon, F., P. Fascia, M. Dauvergne, D. Tenenbaum, H. Planson, A. M. Petion, P. Pothier, & E. Kohli. 1999. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3055-3058.

C

Carter, M. J. & M. M. Willcocks. 1996. The molecular biology of astroviruses. *Arch. Virol.* 12(Suppl): 277-285.

Caul, E. O. & H. Appleton. 1982. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses. *J. Med. Virol.* 9: 257-265.

Coppo, P., C. Scieux, F. Ferchald, J. Clauvel, & K. Lassoued. 2000. Astrovirus enteritis in a chronic lymphocytic leukemia patient treated with fludarabine monophosphate. *Ann. Hematol.* 79: 43-45.

Cubitt, D. W., D. K. Mitchell, M. J. Carter, M. M. Willcocks, & H. Holzel. 1999. Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a pediatric bone marrow transplant unit. *J. Med. Virol.* 57: 313-321.

Cunliffe, N. A., W. Dove, J. S. Gondwe, B. D. M. Thindwa, J. Greensill, J. L. Holmes, J. S. Bresee, S. S. Monroe, R. I. Glass, R. L. Broadhead, M. E. Molyneux, & C. A. Hart. 2002. Detection and characterisation of human astroviruses in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J. Med. Virol.* 67: 563-566.

D

Donnelly, G., F. Superti, A. Tinari, & M. L. Marziano. 1992. Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells. *J. Med. Virol.* 38: 217-225.

E

Englund, L., M. Chriel, H. H. Dietz, & K. O. Hedlund. 2002. Astrovirus epidemiologically linked to pre-weaning diarrhoea in mink. *Vet. Microbiol.* 85: 1-11.

F

Foley, B., J. O'Mahony, S. M. Morgan, C. Hill, & J. G. Morgan. 2000 Detection of sporadic cases of Norwalk-like virus (NLV) and astrovirus infection in a single Irish hospital from 1996 to 1998. *J. Clin. Virol.* 17: 109-117.

G

Gaggero, A., M. O'Ryan, J. S. Noel, R. I. Glass, S. S. Monroe, N. Mamani, V. Prado, & L. F. Avendaño. 1998. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3691-3693.

Geigenmüller, U., N. H. Ginzton, & S. M. Matsui. 1997. Construction of a genome-length c clone for human astrovirus serotype 1 and synthesis of infectious RNA transcripts. *J. Virol.* 71: 1713-1717.

- Geigenmüller, U., T. Chew, N. Ginzton, & S. M. Matsui.** 2002a. Processing of nonstructural protein 1a of human astrovirus. *J. Virol.* 76: 2003-2008.
- Geigenmüller, U., N. H. Ginzton, & S. M. Matsui.** 2002b. Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. *J. Gen. Virol.* 83: 1691-1695.
- Gibson, C. A., J. Chen, S. A. Monroe, & M. R. Denison.** 1998. Expression and processing of nonstructural proteins of the human astroviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440: 387-391.
- Glass, R. I., J. Noel, D. Mitchell, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, L. K. Pickering, P. Dennehy, G. Ruiz-Palacios, M. L. de Guerrero, & S. S. Monroe.** 1996. The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review. *Arch. Virol.* 12(Suppl.): 287-300.
- Gough, R. E., M. S. Collins, E. Borland, & I. F. Keymer.** 1984. Astrovirus-like particles associated with hepatitis in ducklings. *Vet. Rec.* 114: 279.
- Gray, J. J., T. G. Wreghitt, W. D. Cubitt, & P. R. Elliot.** 1987. An outbreak of gastroenteritis in a home for the elderly associated with astrovirus type 1 and human calicivirus. *J. Med. Virol.* 23: 377-381.
- Guerrero, M. L., J. S. Noel, D. K. Mitchell, J. J. Calva, A. L. Morrow, J. Martínez, G. Rosales, F. R. Velázquez, S. S. Monroe, R. I. Glass, L. K. Pickering, & G. M. Ruiz-Palacios.** 1998. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr. J. Infect. Dis.* 17: 723-727.
- Guix, S., S. Caballero, C. Villena, R. Bartolomé, C. Latorre, N. Rabella, M. Simó, A. Bosch, & R. M. Pintó.** 2002. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40: 133-139.
- Guix, S., A. Bosch, E. Ribes, L. Dora Martínez, & R. M. Pintó.** 2004. Apoptosis in astrovirus-infected CaCo2 cells. *Virology* 319: 249-261.

H

- Harbour, D. A., C. R. Ashley, P. D. Williams, & T. J. Gruffydd-Jones.** 1987. Natural and experimental astrovirus infection of cat. *Vet. Rec.* 120: 555-557.
- Herrmann, J. E., R. W. Hudson, D. M. Perron-Henry, J. B. Kurtz, & N. R. Blacklow.** 1988. Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 158: 182-185.
- Herrmann, J. E., N. A. Nowak, D. M. Perron-Henry, R. W. Hudson, W. D. Cubitt, & N. R. Blacklow.** 1990. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 161: 226-229.
- Herrmann, J. E., D. N. Taylor, P. Echeverria, & N. R. Blacklow.** 1991. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N. Engl. J. Med.* 324: 1757-1760.
- Hoshino, Y., J. F. Zimmer, N. S. Moise, & F. W. Scott.** 1981. Detection of astroviruses in faeces of a cat with diarrhoea. *Arch. Virol.* 70: 373-376.
- Hudson, R. W., J. E. Herrmann, and N.R. Blacklow.** 1989. Plaque quantitation and virus neutralization assay for human astrovirus. *Arch. Virol.* 108:33-8

I

Imada, T., S. Yamaguchi, & H. Kawamura. 1979. Pathogenicity for baby chicks of the G- 4260 strain of the picornavirus "avian nephritis virus". *Avian Dis.* 23: 582-588.

J

Jiang, B., S. S. Monroe, E. V. Koonin, S. E. Stine, & R. I. Glass. 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10539-10543.

Jonassen, C. M., T. O. Jonassen, Y. M. Saif, D. R. Snodgrass, H. Ushijima, M. Shimizu, & B. Grinde. 2001. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J. Gen. Virol.* 82: 1061-1067.

Jonassen, C. M., T. O. Jonassen, T.M. Sveen, & B. Grinde. 2003. Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. *Virus Res.* 91: 195-201.

K

Kang, Y. H., Y. K. Park, J. B. Ahn, J. D. Yeun, & Y. M. Lee. 2002. Identification of human astrovirus from stool samples with diarrhea in Korea. *Arch. Virol.* 147: 1821-1827.

Kapikian, A. Z., R. G. Wyatt, R. Dolin, T. S. Thornhill, A. R. Kalica, & R. M. Chanock. 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* 10: 1075-1081.

Kiang, D. & S. M. Matsui. 2002. Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural protein. *J. Gen. Virol.* 83: 25-34.

Koci, M. D., B. S. Seal, & S. Schultz-Cherry. 2000. Molecular characterization of an avian astrovirus. *J. Virol.* 74: 6173-6177.

Koonin, E. V. 1991. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 71: 2197-2206.

Koopmans, M. P. G., M. H. L. Bijen, S. S. Monroe, & J. Vinjé. 1998. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5: 33-37.

Kriston, S., M. M. Willcocks, M. J. Carter, & W. D. Cubitt. 1996. Seroprevalence of astrovirus types 1 to 6 in London determined using recombinant virus antigen. *Epidemiol. Infect.* 117: 159-164.

Kurtz, J. B., T. W. Lee, J. W. Craig, & S. E. Reed. 1979. Astrovirus infection in volunteers. *J. Med. Virol.* 3: 221-230.

Kurtz, J. B., T. W. Lee, & A. J. Parson. 1980. The action of alcohols on rotavirus, astrovirus and enterovirus. *J. Hosp. Infect.* 1: 321-325.

Kurtz, J. B. & T. W. Lee. 1984. Human astrovirus serotypes. *Lancet* 2: 1405.

Kurtz, J. B. & T. W. Lee. 1987. Human and animal. Novel Diarrhoea Viruses. Ciba Foundation symposium 128. Chichester: Wiley, 92-107.

L

Lee, T. W. & J. B. Kurtz. 1977. Astroviruses detected by immunofluorescence. *Lancet* 2: 406.

Lee, T. W. & J. B. Kurtz. 1981. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. *J. Gen. Virol.* 57: 421-424.

Lee, T. W. & J. B. Kurtz. 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol. Infect.* 112: 187-193.

Lewis, D. C., N. F. Lightfoot, W. D. Cubitt, & S. A. Wilson. 1989. Outbreaks of astrovirus type 1 and rotavirus gastroenteritis in a geriatric in-patient population. *J. Hosp. Infect.* 14: 9-14.

Lewis, T. L., H. B. Greenberg, J. E. Herrmann, L. S. Smith, & S. M. Matsui. 1994. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. *J. Virol.* 68: 77-83.

Lewis, T.L., and S.M. Matsui.1996. Astrovirus ribosomal frameshifting in a infection-transfection transiente expression system. *J. Virol.*70:2869-75

Lewis, T.L., and S.M. Matsui.1997. Studies of the astrovirus signal that induces (-1) ribosomal frameshifting. *Adv. Exp. Med. Biol.* 412: 323-30

Lukashov, V. V. & J. Goudsmit. 2002. Evolutionary relationships among *Astroviridae*. *J. Gen. Virol.* 83: 1397-1405.

M

Madeley, C. R. & B. P. Cosgrove. 1975. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2: 451-452.

Maldonado, Y., M. Cantwell, M. Old, D. Hill, M. L. Sánchez, L. Logan, F. Millán-Velasco, J. L. Valdespino, J. Sepúlveda, & S. Matsui. 1998. Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants. *J. Infect. Dis.* 178: 334-339.

Marczinke, B., A. J. Bloys, D. K. Brown, M. M. Willcocks, M. J. Carter, & I. Brierley. 1994. The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *J. Virol.* 68: 5588-5595.

Matsui, M., H. Ushijima, M. Hachiya, J. Kakizawa, L. Wen, M. Oseto, K. Morooka, & J. B. Kurtz. 1998. Determination of serotypes of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiol. Immunol.* 42: 539-547.

- Matsui, S. M., J. P. Kim, H. B. Greenberg, L. M. Young, L. S. Smith, T. L. Lewis, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, K. Dupuis, & G. R. Reyes.** 1993. Cloning and characterization of human astrovirus immunoreactive epitopes. *J. Virol.* 67: 1712-1715.
- Matsui, S. M. & H. B. Greenberg.** 2001a. Astroviruses, p. 875-893. In: B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. A. Martin, R. A. Lamb, B. Roizman, and S. E. Strauss (ed.), *Fields virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia. Pa.
- Matsui, S. M., D. Kiang, N. Ginzton, T. Chew, & U. Geigenmüller-Gnirke.** 2001b. Molecular biology of astroviruses: selected highlights. Gastroenteritis viruses. Novartis Foundation Symposium. 238: 219-236.
- Medina, S. M., M. F. Gutierrez, F. Liprandi, & J. E. Ludert.** 2000. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3481-3483.
- Méndez, E., T. Fernández-Luna, S. López, M. Méndez-Toss, & C. Arias.** 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J. Virol.* 76: 7996-8002.
- Méndez, E., M. P. E. Salas-Ocampo, M. E. Munguía, & C. F. Arias.** 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *J. Virol.* 77: 11378-11384.
- Méndez-Toss, M., P. Romero-Guido, M. E. Munguía, E. Méndez, & C. F. Arias.** 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *J. Gen. Virol.* 81: 2891-2897.
- Méndez-Toss, M., D. D. Griffin, J. Calva, J. F. Contreras, F. I. Puerto, F. Mota, H. Guiscafre, R. Cedillo, O. Muñoz, I. Herrera, S. López, & C. F. Arias.** 2004. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J. Clin. Microbiol.* 42: 151-157.
- Midthun, K., H. B. Greenberg, J. B. Kurtz, G. W. Gary, F. Y. Lin, & A. Z. Kapikian.** 1993. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *J. Clin. Microbiol.* 31: 955-962.
- Mitchell, D. K., D. O. Matson, X. Jiang, T. Berke, S. S. Monroe, M. J. Carter, M. M. Willcocks, & L. K. Pickering.** 1999. Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers *J. Infect. Dis.* 180: 514-517.
- Molberg, O., E. M. Nilsen, L. M. Sollit, H. Scott, P. Brandtzaeg, E. Thorsby, & K. E. Lundin.** 1998. T cells with specific reactivity against astrovirus isolated from human small intestine. *Gastroenterology* 114: 115-122.
- Monroe, S. S., S. E. Stine, L. Gorelkin, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, & R. I. Glass.** 1991. Temporal synthesis of proteins and RNAs during Human Astrovirus infection of cultured cells. *J. Virol.* 65: 641-648.
- Monroe, S. S., B. Jiang, S. E. Stine, M. Koopmans, & R. I. Glass.** 1993. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of *Astroviridae* as a new family of RNA viruses. *J. Virol.* 67: 3611-3614.
- Monroe, S. S., M. J. Carter, J. E. Herrmann, et al.** 1995. Family *Astroviridae*. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DL, et al. eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. New York: Springer-Verlag 364: 367.

Mustafa, H., E. A. Palombo, & R. F. Bishop. 2000. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1058-1062.

N

Naficy, A. B., M. R. Rao, J. L. Holmes, R. Abu-Elyazeed, S. J. Savarino, T. F. Wierzba, R. W. Frenck, S. S. Monroe, R. I. Glass, & J. D. Clemens. 2000. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. *J. Infect. Dis.* 182: 685-690.

O

Oishi, I., K. Yamazaki, T. Kimoto, Y. Minekawa, E. Utagawa, S. Yamazaki, S. Inouye, G. S. Grohmann, S. S. Monroe, S. E. Stine, C. Carcamo, T. Ando, & R. I. Glass. 1994. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *J. Infect. Dis.* 170: 439-443.

P

Pager, C. T. & A. D. Steele. 2003. Astrovirus-associated diarrhea in South African adults. *Clin. Inf. Dis.* 35: 1452-1453.

Pang, X. L. & T. Vesikari. 1999. Human astrovirus-associated gastroenteritis in children under 2 years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Acta Paediatr.* 88: 532-536.

Pintó, R. M., F. X. Abad, R. Gajardo, & A. Bosch. 1996. Detection of infectious astroviruses in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1811-1813.

R

Risco, C., J. L. Carrascosa, A. M. Pedregosa, C. D. Humphrey, & A. Sánchez-Fauquier. 1995. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. *J. Gen. Virol.* 76: 2075-2080.

Román, E., I. Wilhelmi, J. Colomina, J. Villar, M. L. Cilleruelo, V. Nebreda, M. Del Alamo, & A. Sánchez-Fauquier. 2003. Acute viral gastroenteritis: proportion and clinical relevance of multiple infections in Spanish children. *J. Med. Microbiol.* 52: 435-440.

S

Sánchez-Fauquier, A., A. L. Carrascosa, J. L. Carrascosa, A. Otero, R. I. Glass, J. A. López, C. San Martín, & J. A. Melero. 1994. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology* 201: 312-320.

Schlesinger, S. & M. J. Schlesinger. 1996. *Togaviridae*, p.825-841. In: B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. A. Martin, R. A. Lamb, B. Roizman, and S. E. Strauss (ed.), *Fields virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.

Shastri, S., A. M. Doane, J. Gonzales, U. Upadhyayula, & D. M. Bass. 1998. Prevalence of astroviruses in a children's hospital. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2571-2574.

Shimizu, M., J. Shirai, M. Narita, & T. Yamane. 1990. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. *J. Clin. Microbiol.* 28: 201-206.

Snodgrass, D. R. & E. W. Gray. 1977. Detection and transmission of 30 nm virus particles (astrovirus) in faeces of lambs with diarrhoea. *Arch. Virol.* 55: 287-291.

Snodgrass, D. R., K. W. Angus, E. W. Gray, J. D. Menzies, & G. Paul. 1979. Pathogenesis of diarrhoea caused by astrovirus infections in lambs. *Arch. Virol.* 60: 217-226.

S. Jane Flint, R. M. Krug, Jane S. Flint, Lynn W. Enquist, Vincent R. Racaniello, A. M. Skalka. 1999. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control.

I

Taylor, M. B., W. O. K. Grabow, & W. D. Cubitt. 1997. Propagation of human astrovirus in the PLC/PRF/5 hepatoma cell line. *J. Virol. Methods* 67: 13-18.

Traore, O., G. Belliot, C. Mollat, H. Piloquet, C. Chamoux, H. Laveran, S. S. Monroe, & S. Billaudel. 2000. RT-PCR identification and typing of astroviruses and Norwalk-like viruses in hospitalized patients with gastroenteritis: evidence of nosocomial infections. *J. Clin. Virol.* 17: 151-158.

Tzipori, S, J. D. Menzies, & E. W. Gray. 1981. Detection of astrovirus in the faeces of red deer. *Vet. Rec.* 108: 286.

V

van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Manilov, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, & R. B. Wickner. 2000. *Virus taxonomy*, p. 1162 Academic Press, San Diego.

W

Wang, Q., J. Kakizawa, L. Weng, M. Shimizu, O. Nishio, Z. Fang, & H. Ushijima. 2001. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. *J. Med. Virol.* 64: 245-255.

Willcocks, M. M., M. J. Carter, F. R. Laidler, & C. R. Madeley. 1990. Growth and characterization of human faecal astrovirus in a continuous cell line. *Arch. Virol.* 113: 73-82.

Willcocks, M. M., N. Ashton, J. B. Kurtz, W. D. Cubitt, & M. J. Carter. 1994a. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *J. Virol.* 68: 6057-6058.

Willcocks, M. M., A. S. Boxall, & M. J. Carter. 1999. Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins. *J. Gen. Virol.* 80: 2607-2611.

Williams, F. P. 1980. Astrovirus-like, coronavirus-like, and parvovirus-like particles detected in the diarrhea stools of beagle pups. *Arch. Virol.* 66: 216-226.

Williams, F. P. 1989. Electron microscopy of stool-shed viruses: retention of characteristic morphologies after long-term storage at ultralow temperatures. *J. Med. Virol.* 29: 192-195.

Wood, D. J., T. J. David, I. L. Chrystie, & B. Totterdell. 1988. Chronic enteric virus infection in two T-cell immunodeficient children. *J. Med. Virol.* 24: 435-444.

Woode, G. N. & J. C. Bridger. 1978. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. *J. Med. Microbiol.* 11: 441-452.

Y

Yuen, K. Y., P. C. Woo, R. H. Liang, E. K. Chiu, F. F. Chen, S. S. Wong, Y. L. Lau, S. Y. Ha, J. S. Peiris, H. Siau, & T. K. Chan. 1998. Clinical significance of alimentary tract microbes in bone marrow transplant recipients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 75-81.

9.1.- ARTÍCULO ANEXO

Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome

Martha Méndez-Toss, Pedro Romero-Guido, Maria Elena Munguía, Ernesto Méndez and Carlos F. Arias

Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Colonia Miraval, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

Human astroviruses are an important cause of gastroenteritis. As part of a molecular epidemiological study carried out in Mexico a human astrovirus isolate, Yuc-8, was adapted to grow in CaCo-2 cells, and its entire genome was sequenced. A 15 amino acid deletion in ORF1a, which has been associated with adaptation of astroviruses to grow in cells other than CaCo-2, was present in Yuc-8. Comparative sequence analysis of the Yuc-8 ORF2 with reported human astrovirus sequences revealed that this isolate belongs to genotype (serotype) 8. Two distinct domains in ORF2 were observed: an amino-terminal domain (residues 1 to 415), with identities higher than 81% among the strains analysed, and a carboxy-terminal domain (residues 416 to 782) with identities between 36 and 60%. Two non-superimposable phylogenetic trees were generated by separate analysis of these two domains, suggesting that a differential selective pressure is exerted along the structural polypeptide.

Human astroviruses are recognized as an important cause of infantile gastroenteritis around the world (Herrmann *et al.*, 1991). Astrovirus virions are formed by a non-enveloped protein capsid which surrounds a genome consisting of a positive-sense, single-stranded RNA molecule of 6.8 to 7.2 kb in length (Jiang *et al.*, 1993). The genomic RNA has three open reading frames (ORFs) designated 1a, 1b and 2. ORF1a and ORF1b code apparently for the nonstructural proteins of the virus; ORF1a contains viral serine protease and nuclear localization signal motifs; ORF1b contains motifs suggestive of an RNA-dependent RNA polymerase (Jiang *et al.*, 1993;

Willcocks *et al.*, 1994*b*). On the other hand, ORF2 encodes the structural viral polypeptides (Sanchez-Fauquier *et al.*, 1994). The virus genome, which functions as the mRNA for the nonstructural proteins, is translated into two polyproteins. One comprises exclusively ORF1a, while the other includes both ORF1a and ORF1b (Willcocks *et al.*, 1999), and is generated as result of a translational frameshift occurring between these two ORFs (Lewis & Matsui, 1997; Marczinke *et al.*, 1994). It is thought that both nonstructural polyproteins are auto-processed by a viral protease encoded in ORF1a (Willcocks *et al.*, 1999). On the other hand, the structural proteins coded by ORF2 are translated from a subgenomic RNA synthesized during replication of the virus. A 86 to 90 kDa polyprotein is produced that is finally processed into three to five mature polypeptides (Bass & Qiu, 2000; Sanchez-Fauquier *et al.*, 1994). The subgenomic RNA is 3'-collinear with the genomic RNA and both are polyadenylated (Monroe *et al.*, 1991, 1993).

Based on the virus reactivity with polyclonal antibodies, human astroviruses (HAstVs) have been classified into seven serotypes (HAstV-1 to -7) (Herrmann *et al.*, 1988). Phylogenetic grouping of HAstV based on nucleotide sequence analysis of a limited region of ORF2 (Belliot *et al.*, 1997; Noel *et al.*, 1995) showed a good correlation between genotype and serotype, and recently the existence of an eighth HAstV serotype has been suggested based on genotyping of an HAstV strain isolated in UK (Belliot *et al.*, 1997). Only three additional strains of this genotype 8 astrovirus, isolated in Australia, Uganda and Ghaza, have been reported, which is why it is considered to be a rare serotype (Mustafa *et al.*, 2000). In a recent multicentric study carried out in Mexico (unpublished), it was found that six HAstV serotypes (1 to 4, 6 and 8) co-circulated in a single period of 6 months, with serotype 1 being the most frequent, as found in other studies from different geographical regions (Gaggero *et al.*, 1998; Noel & Cubitt, 1994; Palombo & Bishop, 1996; Shastri *et al.*, 1998). In one of the locations (Mérida City, Yucatan) included in the Mexican study, three of the eight HAstV strains detected belonged to genotype 8 (assignment made based on the sequence of the 3'-end of ORF2), suggesting that these strains might be more epidemiologically relevant than previously recognized. In this work, we adapted one of the genotype 8

Author for correspondence: Ernesto Méndez.

Fax +52 73 17 2388. e-mail ernesto@ibt.unam.mx

The GenBank accession number of the sequence reported in this paper is AF260508.

(a)

Yuc-8 740 GDDVEFDYTEVINFDQAKPTPAPRTTKP-----KPCPEPKIEAQPLDLSQKKEKQP-----EHEQQVAKPTKPKIEPQPYSQTYGKA 818
 HAsT-1 739I.....Q-----I....EV.S.....SEYEQQVVKSTKPKQQL.....V.I....S..... 832
 HAsT-2 739-----ET.T.....V.S....N..... 817
 HAsT-3 739S..QQANTSQ..R..LEA.....-----M..N..... 824

┌──────────┐
 │ │
 └──────────┘
 in/del I

┌──────────────────┐
 │ │
 └──────────────────┘
 in/del II

(b)

Yuc-8 MASKSDKQVTVEVNNN--GRSRSKSRARSQSRGRGRSVKITVNSHNKGRRQNGRNKYQSNQVRKIVNKQLRKQGVTPKPAICQTATATLGTIGSNTTGATEIEACILLNPVLVKDATG 118
 HAsT-8--.....N.....G..... 118
 HAsT-1N.....S.--.N.....DK.....R.RA..P..D.R..S..N.....R.....V...S.T..... 118
 HAsT-2N.--.N.....R.....R.....T..... 118
 HAsT-3K..NN..N..R.....K.....RSR.....D.....N..T.....R.....S.T..... 120
 HAsT-4H.E..SST--...R.....SN..GSP.....T..... 118
 HAsT-5PS.....---R..P.....DK.....R.....H.....N.....R.....V...S.T...G..... 117
 HAsT-6T--.G.....Q.....R.....N.....K.....S.T.....E.... 118

Yuc-8 STQFGPQALGAQYSMWKLYLNVRLLTSMVGASAVNGTVVRISLNPTSTPSSTSWSGLGARKHLDVTVGKNAVFKLKPSDLGGPRDGWLLTNTNDNASDTLGPSEIHTLGGQTMSSYQNT 238
 HAsT-8S.....M.V...T.DAI.....N.....I.....D...H..... 238
 HAsT-1K.....L.V.....T.....R...K.E 238
 HAsT-2K.....L.....M...R...R.....K...K.E 238
 HAsT-3K.....V.....A.....V...M...K.E 240
 HAsT-4PT.....I.....A..... 238
 HAsT-5K.....S..D..V.....R...Q 237
 HAsT-6V.....I.....V...R...Q 238

VR1

* *

Yuc-8 QFTGGLFLVELSSAWCFTGYAANPNLVNLRKSTDKSVNVTFEGSAGTPLIMNVPEHSHFARTAVEHSSLSTLSLRAGGESSSDTVWQVLTAVSAAELVTPPPFNWLVKGGWVFKLIAG 358
 HAsT-8W...T.....G.....D..... 358
 HAsT-1A.E.....NQ.P.....S.....S.G.....VLAR.TTP.T.A..ERITP..... 358
 HAsT-2A.E.....HE.....K.....A.....M.EQ..I..TF...DAT.....A...I..... 358
 HAsT-3A.E.....Q.....N...K...A.....AR..VP.T.A.T.QNITP..... 360
 HAsT-4AR..D.....M.....NCL..... 358
 HAsT-5A.E.....M...Q...N...E.V.S..AT...V.AV.AR.T.P..A..ERITP..... 357
 HAsT-6A.E.....Q.....V...AA.....VAQR.T.P..MA..ENTA..... 358

Fig. 1. For legend see facing page.

```

* ↓ * * VR2 ↓
Yuc-8 RARTGARRFYVYLSYQDALSNKPALCTGGVPASAROSNEVVRITLQFTQMNQPSLGHGATPMTIFGRSIPPEGEQFRVLLITVGGPPMAPNTANSQNWNKTIVPP---ENQYTVKIGIDLEHY 475
HastV-8 .....P.....R..... 475
HastV-1 .T...S.S...P.....ST.GGM.TR...T.....EA.AAI...A...EYK.V.F.S.S...AN.K.T...PLDA.---SGH.N...AK.VD.. 475
HastV-2 .T...TKQ...P.....TG-GVLRITPV.....EHTA.I.SIVQD.SGEL.....SI.S.S.DR.V.L...LTA.GTNS.DNL...AH..G.. 477
HastV-3 ....T.S...P.....SA.SGM.TRAA.M.....EMTA.L.A.S...DN.N.V...I.Q.L...LTK...L...T.S.---Q.HHV...AK.VNN. 477
HastV-4 .....P.....S.YT.....A.L...V...D.K.IM...ALVQ..RSDT...LFT.VT..TG---HDAARV.WNTQ.. 475
HastV-5 .T.N.T.S...P.....L.SGL.ATSA.T.....ENTA.L...ATA.DRLK.I...Q.VT...EN.K...G...NT.A-----EVI...VNTQS. 472
HastV-6 .V.N.N.S...A.....STSG.M.TRPA.M.....E.A.L...TS..TLK...N.IS...ET.K.T...E.----GAV.R..R.TQ.. 473

Yuc-8 TTMQGFTPVESVSWYTADFQPSDEPSPIPGLYARVNNTKKADVYGVQFQKSSHTNNRHQITSVFLVRVITSFQVINYTSYFIRGAESGNSVSNLKRIRDQTYHTPLQFTQGWYLLTSTVM 595
HastV-8 .....V..... 595
HastV-1 L.....SIA..D...I...EA.A.K.QVL..IS.....A.K.VTAQ...K.V.L...K...G...N...L...Y.ASAT.DATT..LV.GD..TAGIS...G...N.SI 595
HastV-2 LI...MHKPT.E...P...RD.T.A.MSVM..I.....FMK...N.Y.....I..IKPLAD.K.QC.M...K.ESHNDG.A..TV.SM.SPETIR.QV.E.....TL 597
HastV-3 .....IS..D...T...EA.T...QVL..SS.....AI..YLNNQ...KV.L..I...K...N...L...Y.SYGT.TT.E...V.SD.TAQDVN.PV...M...AI 596
HastV-4 L.I...LLID.LE.L.PNL.E.QE.PS..E.GVY.GIH...L.FM.YVNP...K.VS.I..IKPTEN.S.T.M...F.ESQ..Q.A...P.WQQTVN.QR...V.N.AI 595
HastV-5 NV.N...MIS.ID..DEEM..LEV.A.MSE.LVMKGIN.....AA..Y.N.IS..K...Y.I..KEN...T.HL...F.EKVDITATELM...P...TVN.V.DN.....L 592
HastV-6 C.LN...LITK.D.F.EE...E..A.VQ..MVLGD.H.....AA..Y.NPI..DKQEV.....NEG...T.HL...Y.NSVMTDA.E.I...SA.R..TVR.Y..S.....L 593

Yuc-8 HDGPTSSGWWMNQELTNNIAYRVDPGMMYLITPPPAASQLYFELHTVLPQARSEEPETYVD-----APLPEEPIIEEETDSDFFESTEDENDEVDVDFDLHPSS-ESDDDDVEN 703
HastV-8 .....V..I...TH...R...A...V.....L.V.SLV.D.....DI..... 703
HastV-1 V..AMPP...N.V..KT.T..HM.K.LVH..M.L.EST.MCY.ML.SI.RS.ASGHYES.---NIEYLDAPDSAD-QFK.DI...T.I...D.A...IIDT.--DEE.GN.T 708
HastV-2 KENNLPE...DRV..KSDTP.YA.QALT.F...VD..IL..GN.T..RIS.PPDNPSGRYMESHQQDCDSDEDDCCENV...ETED.ED...D.A...SPYSSEPE.SD.. 717
HastV-3 FNA.APP..I.Q.V..L.DT..LI.Q...H..M...NT..L.MR.SISGS..MISSEEP.THEPGDEWCDALDASD-SRVLL...YED.ED...D.A...S.YGSEPE..D.. 715
HastV-4 RN..PP...D.I...ESI.YA.QVLAHF.N...QN.KI...V..TM..SSVRNIGLEE.-----Q---TDNQWQEPDEDVQTST.ESDYETDSELEG...E.SNT 694
HastV-5 .T.SLP.....HM..EN.I..Q..KH.M.T..VS.....ML.S...KA.YLDQGDQ---AVVTYDS---GQALFSA.....T.....L... 704
HastV-6 .T..PV...L...Q.DQ..II.Q.I.H...VS..I...MA.LV..T..GGG..GLE---LVMGLSDDEY.ISHVND...EYET..D...T.....CCT.-D.E...-I.. 707

Yuc-8 DRATLLSTLLNQGISVERATRITNGAFP---TRAARVRRSVYNDLLVSGLSPGAASHACEQARRAGDNHDLQLSGSRDHAE 782
HastV-8 G.R.....P.TD.M..... 782
HastV-1 .V.....V...MTMT...ARR.....LSD.IK.G..M...V...N...E..K.VGETNPCT...G... 787
HastV-2 N.V.....I...MT.....KR.....C.EKLK...M...A..A..SS...N..DE..NV.S.QLAK...D.G... 796
HastV-3 N.V.....I...MT.....KR.....S.GKTK...M...A...N...E..IM.I.QTPNV..D.G... 794
HastV-4 C.ELVIN..V...R...Y.GMS.Y.NVEWGSGEQSTSQHIQELSSDDVGAGAHY.CV..RKQQ-----SLNQ...G... 771
HastV-5 N.V.....I...M...K..SN.....L.....V.D.D.....KV.....T...A... 783
HastV-6 N.V.....I...VT.D..M...R.....PNYKP..EPS...APSDCLAT.R...NET-----C.....G... 778

```

Fig. 1. (a) Alignment of a fragment of the ORF1a sequence of Yuc-8 with reported sequences of human astroviruses of serotypes 1, 2 and 3, around the variable region which contains short in/del regions (representing inserted or deleted sequences, respectively, among the HAstV strains analysed). In/del regions I and II are marked. Accession numbers of the compared sequences are: Z25571 (HAstV-1), L13745 (HAstV-2) and AF141381 (HAstV-3). (b) Alignment of the complete Yuc-8 ORF2 amino acid sequence with sequences of HAstV of several serotypes. Variable regions VR1 and VR2 in the amino-terminal 415 amino acids of the polyprotein are underlined. The arrows show the arginine residues which are cleaved to yield VP79, VP29 and VP26, according to Bass & Qiu (2000), and Sanchez-Fauquier *et al.* (1994). Asterisks above the sequence denote the conserved basic amino acid residues susceptible to trypsin (see text). Alignment was made by ClustalW analysis (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) of sequences with the following accession numbers: L23513 (HAstV-1), A45695 (HAstV-2), AF141381 (HAstV-3), Z33883 (HAstV-4), U15136 (HAstV-5), Z46658 (HAstV-6) and Z66541 (HAstV-8). HAstV-7 (accession number L38508) was not included in this analysis since only 118 of the 782 amino acid residues of the complete ORF2 have been reported. In (a) and (b), dots indicate amino acid sequence identity, and only amino acid changes are marked; a dash denotes a deletion. The single-letter amino acid code is used.

Table 1. Percentage amino acid identity between human astrovirus structural proteins of different serotypes

Numbers are percentage identity according to a ClustalW analysis. For simplicity, strains of the same serotype were named A, B, C and D. Accession numbers for sequences used to generate the data in this table are Z25771, S68561 and L23513 for strains of HAstV-1; L41395, L06802 and L13745 for strains of HAstV-2; AF141381 and AF117209 for strains of HAstV-3; Z33883 and U15136 for strains of HAstV-4 and HAstV-5, respectively; Z46658, AB031031, AB031030 and AB013618 for HAstV-6 and Z66541 for HAstV-8. The Yuc-8 sequence was determined in this work. Bold letters denote identities between proteins of viruses belonging to the same serotype.

Serotype / Strain		Amino acid percentage identity															
		Yuc-8	8			1			2			3		4	5	6	
			A	B	C	A	B	C	A	B				A	B	C	D
Yuc-8		100															
HAstV-8		94	100														
A		70.9	68.5	100													
HAstV-1																	
B		70.9	68.5	100	100												
C		70.8	68.5	97.6	97.3	100											
HAstV-2																	
A		69.6	67.8	68.3	68.3	69.3	100										
B		69.5	67.6	68.1	68.1	69.1	99.9	100									
C		69.6	67.8	68.3	68.3	69.3	100	99.9	100								
HAstV-3																	
A		71.6	69.3	75.3	75.3	75.7	71.8	71.7	71.8	100							
B		72.1	69.4	75.2	75.2	75.6	71.7	71.6	71.7	98.2	100						
HAstV-4																	
		69.2	67.3	61.2	61.2	60.7	64.1	64	64.1	59.6	60	100					
HAstV-5																	
		73.3	70.6	69.3	69.3	69.5	65	64.9	65	70.4	70.4	61.7	100				
A		72	70	70.2	70.2	70.3	65.8	65.7	65.8	70.6	71.9	62.6	74	100			
HAstV-6																	
B		71.7	70.3	71.4	71.4	71.4	66.7	66.6	66.7	70.9	72.3	62.6	75.2	95.5	100		
C		71.6	70.3	71.3	71.3	71.3	66.6	66.5	66.6	70.8	72.2	62.3	75.1	95.4	99.6	100	
D		71.7	70.3	71.4	71.4	71.4	66.7	66.6	66.6	70.9	72.3	62.4	75.2	95.5	99.7	99.9	100

HAstV strains (named Yuc-8) to grow in CaCo-2 cells, and determined its complete genomic nucleotide sequence, the first for an HAstV-8 strain.

For isolation of the virus, a stool sample was diluted 1:2 in PBS, extracted with Freon, and filtered through a 0.22 µm membrane. This material was treated with trypsin (10 µg/ml) for 1 h at 37 °C, and inoculated into a CaCo-2 cell monolayer. After 60 min, the inoculum was removed, fresh Eagle's minimum essential medium was added, and the cells were incubated at 37 °C for 3 days. The virus was harvested by three freeze-thaw cycles, and was passaged again in the same cells, as described above. After seven passages, the presence of the virus was confirmed by immune electron microscopy with a hyperimmune serum to HAstV-1 (Herrmann *et al.*, 1990); by ELISA (IDEIA Astrovirus, Dako); by immunocytochemistry with monoclonal antibody 8G4, which recognizes HAstV-1 to -7 (Bass & Upadhyayula, 1997); and by RT-PCR with oligonucleotides Mon244 and Mon245 (Noel *et al.*, 1995). Total RNA from Yuc-8-infected cells was obtained with Trizol (Gibco-BRL), and used as template to amplify the astrovirus genome by RT-PCR. Reverse transcriptase SuperScript II (Gibco-BRL) and Vent DNA polymerase (New England

Biolabs) were used for the RT-PCR reactions. Oligonucleotides synthesized were initially based on the previously reported sequence for HAstV-1 (accession no. Z25771), and subsequently based on the sequence obtained from Yuc-8. The amplified DNA fragments were sequenced with an ABI Prism DNA automatic sequencer, model 377-18 (Perkin Elmer). The sequence of the 5' non-translated region (NTR) was determined from a PCR fragment obtained with an upstream 20-mer oligonucleotide corresponding to the 20 5'-end nucleotides which are conserved among astrovirus serotypes 1, 2 and 3. Nucleotide sequence of the 3' NTR was determined from a DNA fragment obtained by RT-PCR with oligo(dT) and oligonucleotide Beg (Saito *et al.*, 1995) as primers. At least three PCR fragments of a given region, amplified independently, were used for determining the consensus sequence.

The full-length genomic RNA of HAstV Yuc-8 consists of 6759 bases, followed by a poly(A) tract. It has a 5' NTR and a 3' NTR of 83 and 85 nucleotides, respectively, and it is organized in three sequential open reading frames corresponding to ORFs 1a, 1b and 2 (Jiang *et al.*, 1993; Willcocks *et al.*, 1994b). The encoded polyproteins have the characteristic motifs described above.

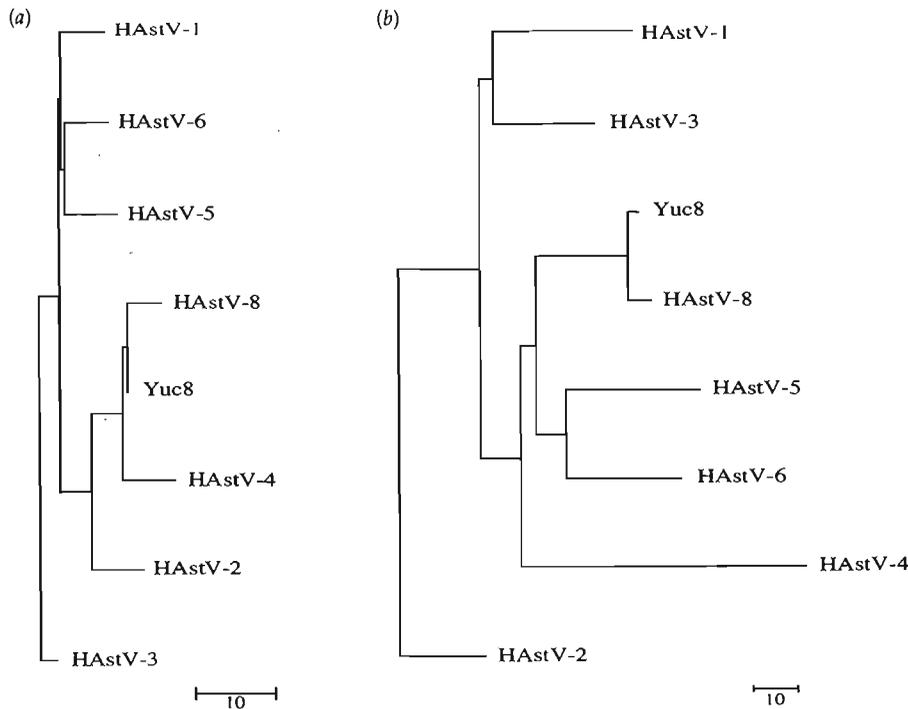


Fig. 2. Dendrograms showing the genetic relatedness of the ORF2 amino acid sequence from astrovirus serotypes 1 to 6 and 8. (a) Conserved domain of ORF2 comprising amino acids 1 to 415. (b) Hypervariable domain of ORF2 comprising amino acids 416 to 782 (Yuc-8 numbering). The scale bars in (a) and (b) represent 10 amino acid substitutions per each 100 residues. The dendrograms were generated with the GrowTree program of the Genetics Computer Group sequence analysis package (<http://gcg.ceingebi.unam.mx/gcg-bin/seqweb.cgi>), using the Kimura distance correction method and the neighbour-joining construction method. Accession numbers of the compared sequences are: L23513 (HAstV-1), A45695 (HAstV-2), AF141381 (HAstV-3), Z33883 (HAstV-4), U15136 (HAstV-5), Z46658 (HAstV-6) and Z66541 (HAstV-8). HAstV-7 was not included in this analysis since its complete sequence has not been reported.

Comparison of the non-structural polyprotein region of astrovirus Yuc-8 with the corresponding sequence of viruses belonging to serotypes 1, 2 and 3 showed a high level of conservation among these strains (higher than 93% identity at amino acid level). A small region of high variability was found around amino acids 767 and 790 in ORF1a (numbering according to the Yuc-8 sequence), where 7 and 15 residues were missing in Yuc-8 and HAstV-2, as compared to HAstV-3 and HAstV-1, respectively (Fig. 1a, regions in/del I and in/del II, respectively). The absence of the 15 amino acid residues at position 790 (region in/del II) has been associated with the adaptation of astroviruses to HEK and LLCMK2 cells, since viruses grown in these cells, but not in CaCo-2 cells, lack that region (Willcocks *et al.*, 1994a). Yuc-8 is also missing those 15 residues despite its having been adapted to grow in CaCo-2 cells, which suggests that the in/del region II, if it plays a role, is not the only factor involved in adaptation of human astroviruses to a specific cell line. A more detailed analysis of field and culture-adapted astrovirus strains is needed to resolve this issue.

ORF2 of Yuc-8 encodes a polyprotein of 782 amino acids, with an estimated molecular mass of 86.5 kDa. Comparison of the predicted full-length ORF2 amino acid sequence from viruses of different serotypes and geographical regions

indicated a good correlation between genotype and serotype. Within one given serotype where more than one ORF2 complete sequence has been reported, the strains were more than 94% identical (Table 1). Yuc-8 was thus confirmed as a genotype (serotype) 8 virus, since it was more closely related to an isolate of HAstV-8 from the United Kingdom (94% identical) than to HAstV serotypes 1 to 6 (between 69 and 73% identity) (Table 1, Fig. 2). Also, comparison of the Yuc-8 sequence with the partial sequence (amino acid residues 82 to 200) reported for HAstV-7 revealed an identity of 90% between these two strains, the lowest value for any pairwise comparison when that specific region was considered (not shown).

Knowledge about processing of the ORF2 structural polyprotein is limited. It has been reported that this polyprotein is first cleaved intracellularly at the conserved lysine residue at position 71, to yield a protein of 79 kDa; in the absence of trypsin in the culture medium this seems to be the end product, which can be incorporated into the mature virions (Bass & Qiu, 2000). On the other hand, products of 34, 29 and 26 kDa (VP34, VP29 and VP26) are consistently found in trypsin-treated purified viruses (Bass & Qiu, 2000; Sanchez-Fauquier *et al.*, 1994). VP29 and VP26 were shown by N-terminal sequence analysis to be generated by cleavage of the

polyprotein of HAstV-2 at arginine residues 361 and 395, respectively (numbers based on the Yuc-8 sequence); thus, these two proteins probably share their carboxy terminus (Sanchez-Fauquier *et al.*, 1994). Arg-361 (but not Arg-395) is totally conserved among all astroviruses sequenced to date, as are other trypsin-susceptible cleavage sites present at amino acid residues 347, 354, 359, 365 and 380, which could potentially serve as processing sites (Fig. 1*b*). This trypsin cleavage region is surrounded by highly conserved regions, which could play a structural role to make the cleavage sites accessible for processing. In rotaviruses, the trypsin cleavage region on the VP4 protein, which is responsible for the enhancement of virus infectivity, is also surrounded by highly conserved regions (Lopez *et al.*, 1986).

Alignment of the ORF2 sequences of seven HAstV serotypes (Fig. 1*b*) showed the existence of two distinct domains, which were first observed by Willcocks *et al.* (1995) who analysed three serotypes only. One conserved amino-terminal domain spans amino acid residues 1 to 415, with identities higher than 81% among the different serotypes. Two short variable regions between residues 292 to 319 (VR1) and 386 to 399 (VR2), not reported previously, were observed in this domain (Fig. 1*b*). The highly variable second domain (identities of 36 to 60% among serotypes) starts at amino acid 416 and extends to the end of the protein, but in contrast to the report of Willcocks *et al.* (1995), the conservation at the end of the ORF2 was not observed among the serotypes (Fig. 1*b*).

Phylogenetic analysis of ORF2 showed a completely different genetic relatedness among serotypes 1 to 8 when either of the two domains described above was analysed. The phylogenetic tree generated by comparison of the conserved domain (Fig. 2*a*) was very similar to the trees reported previously by Belliot *et al.* (1997) and Noel *et al.* (1995), who analysed a region of 137 amino acids (residues 73 to 210 of Yuc-8). Serotypes 2, 4 and 8 were found to be closely grouped, while serotypes 1, 3, 5 and 6 were more distantly related to this group (Fig. 2*a*). On the other hand, the dendrogram generated by comparison of the variable domain of ORF2 (residues 416 to 782) was quite different. Serotypes 4 and 8 were among the least related (Fig. 2*b*), which resulted in a phylogenetic tree similar to that reported in another analysis including part of the 3'-end of the astrovirus genome (Monceyron *et al.*, 1997). It is likely that the variable carboxy-terminal domain of the ORF2 polyprotein is subjected to immunological pressure, which probably contributes to the variability observed. In fact, neutralizing antibodies which recognize VP29 and VP26 have been identified (Bass & Upadhyayula, 1997). Furthermore, it is of interest that the genetic relatedness observed among the various HAstV serotypes, when the variable region was analysed, differs so much from the relationships found in the conserved amino-terminal half of the protein. The selective pressure that created these marked deviations from the mutation rate of astroviruses could operate differentially along the ORF2 polyprotein, most likely as the result of a sum of

factors including, among others, the intrinsic structural constraints of the virus particle and the host immune response of the particular populations infected. On the other hand, the non-superimposable dendrograms shown in Fig. 2 could also be the result of intraserotypic astrovirus recombination, suggested as previously (Belliot *et al.*, 1997; Jonassen *et al.*, 1998). Whatever the reason for the observed variations, it is evident that the genomic region chosen to compare different HAstV strains should take into account the differential variability observed in the astrovirus genome, particularly that of ORF2.

We acknowledge the technical assistance of Paul Gaytan, Eugenio López and René Hernández for the synthesis of oligonucleotides and DNA sequencing. We thank Dorsey Bass (Stanford University) for providing monoclonal antibody 8G4, used in this work. This work was partially supported by grants 75197-527106 from the Howard Hughes Medical Institute, MENSE31739, from the National Council for Science and Technology-Mexico, and IN200999 from DGAPA-UNAM.

References

- Bass, D. & Qiu, S. (2000). Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *Journal of Virology* **74**, 1810-1814.
- Bass, D. & Upadhyayula, U. (1997). Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. *Journal of Virology* **71**, 8666-8671.
- Belliot, G., Laveran, H. & Monroe, S. (1997). Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Archives of Virology* **142**, 1323-1334.
- Gaggero, A., O'Ryan, M., Noel, J., Glass, R., Monroe, S., Mamani, N., Prado, V. & Avendano, L. (1998). Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 3691-3693.
- Herrmann, J., Hudson, R., Perron-Henry, D., Kurtz, J. & Blacklow, N. (1988). Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. *Journal of Infectious Diseases* **158**, 182-185.
- Herrmann, J., Cubitt, W., Hudson, R., Perron-Henry, D., Oshiro, L. & Blacklow, N. (1990). Immunological characterization of the Marin County strain of astrovirus. *Archives of Virology* **110**, 213-220.
- Herrmann, J., Taylor, D., Echeverria, P. & Blacklow, N. (1991). Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *New England Journal of Medicine* **324**, 1757-1760.
- Jiang, B., Monroe, S., Koonin, E., Stine, S. & Glass, R. (1993). RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **90**, 10539-10543.
- Jonassen, C., Jonassen, T. & Grinde, B. (1998). A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhinovirus. *Journal of General Virology* **79**, 715-718.
- Lewis, T. & Matsui, S. (1997). Studies of the astrovirus signal that induces (-1) ribosomal frameshifting. *Advances in Experimental Medicine Biology* **412**, 323-330.
- Lopez, S., Arias, C., Mendez, E. & Espejo, R. (1986). Conservation in rotaviruses of the protein region containing the two sites associated with trypsin enhancement of infectivity. *Virology* **154**, 224-7.
- Marczinke, B., Bloys, A., Brown, T., Willcocks, M., Carter, M. & Brierley, I. (1994). The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase

- coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *Journal of Virology* **68**, 5588–5595.
- Monceyron, C., Grinde, B. & Jonassen, T. (1997).** Molecular characterization of the 3'-end of the astrovirus genome. *Archives of Virology* **142**, 699–706.
- Monroe, S., Stine, S., Gorelkin, L., Herrmann, J., Blacklow, N. & Glass, R. (1991).** Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. *Journal of Virology* **65**, 641–648.
- Monroe, S., Jiang, B., Stine, S., Koopmans, M. & Glass, R. (1993).** Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *Journal of Virology* **67**, 3611–3614.
- Mustafa, H., Palombo, E. & Bishop, R. (2000).** Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 1058–1062.
- Noel, J. & Cubitt, D. (1994).** Identification of astrovirus serotypes from children treated at the Hospitals for Sick Children, London 1981–93. *Epidemiology and Infection* **113**, 153–159.
- Noel, J., Lee, T., Kurtz, J., Glass, R. & Monroe, S. (1995).** Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 797–801.
- Palombo, E. & Bishop, R. (1996).** Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 1750–1753.
- Saito, K., Ushijima, H., Nishio, O., Oseto, M., Motohiro, H., Ueda, Y., Takagi, M., Nakaya, S., Ando, T., Glass, R. and others (1995).** Detection of astroviruses from stool samples in Japan using reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *Microbiology and Immunology* **39**, 825–828.
- Sanchez-Fauquier, A., Carrascosa, A., Carrascosa, J., Otero, A., Glass, R., Lopez, J., Martin, C. S. & Melero, J. (1994).** Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology* **201**, 312–320.
- Shastri, S., Doane, A., Gonzales, J., Upadhyayula, U. & Bass, D. (1998).** Prevalence of astroviruses in a children's hospital. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 2571–2574.
- Willcocks, M., Ashton, N., Kurtz, J., Cubitt, W. & Carter, M. (1994a).** Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *Journal of Virology* **68**, 6057–6058.
- Willcocks, M., Brown, T., Madeley, C. & Carter, M. (1994b).** The complete sequence of a human astrovirus. *Journal of General Virology* **75**, 1785–1788.
- Willcocks, M., Kurtz, J., Lee, T. W. & Carter, M. (1995).** Prevalence of human astrovirus serotype 4: capsid protein sequence and comparison with other strains. *Epidemiology and Infection* **114**, 385–394.
- Willcocks, M., Boxall, A. & Carter, M. (1999).** Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins. *Journal of General Virology* **80**, 2607–2611.

Received 9 May 2000; Accepted 8 August 2000