

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y
DESARROLLO, A. C.**

**CARACTERIZACIÓN DE LA ADN POLIMERASA DEL VIRUS DE LA
MANCHA BLANCA (WSSV) Y LA PROTEÍNA ACCESORIA PCNA
(*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus*
*vannamei***

POR

ENRIQUE DE LA RE VEGA

TESIS APROBADA POR LA

**COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

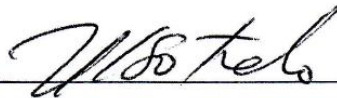
DOCTOR EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

JUNIO DEL 2011

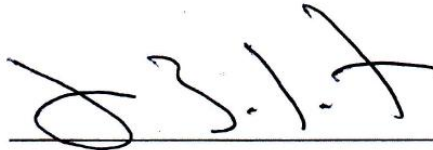
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Enrique de la Re Vega, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



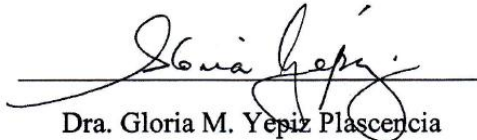
Dr. Rogerio Sotelo Mundo

Director

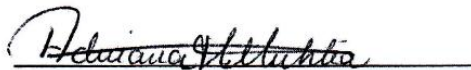


Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro

Co-Director



Dra. Gloria M. Yepiz Plascencia



Dra. Adriana Muhlia Almazan

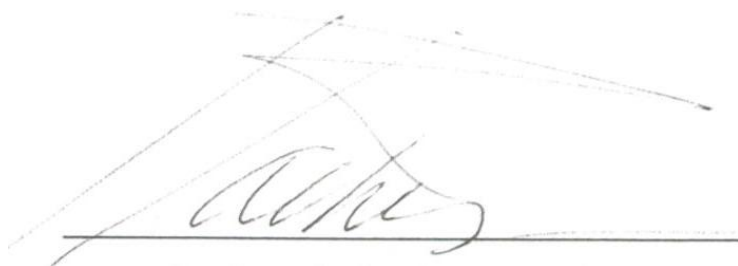


Dr. Jesús Hernández López

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten citas breves del material contenido en este trabajo sin el permiso del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de las tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Pacheco', is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat abstract.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. El apoyo financiero para su realización fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del proyecto CB-2009-01-131859 "Inhibición del metabolismo de nucleótidos como estrategia contra el virus de la mancha blanca del camarón" y de una beca para estudios de doctorado, otorgada por CONACyT.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero para realizar esta tesis a través de la beca doctoral y del proyecto CB-2009-01-131859 "Inhibición del metabolismo de nucleótidos como estrategia contra el virus de la mancha blanca del camarón" y de una beca para estudios de doctorado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo por las facilidades otorgadas para la realización de mi tesis.

Al Laboratorio Nacional de Genómica para la Diversidad Biológica (LANGEBIO) del CINVESTAV Irapuato por su apoyo para realizar una estancia corta de investigación en el laboratorio del Dr. Luis G. Brieba de Castro.

Al Dr. Rogerio Sotelo y Dra. Mary Islas por sus consejos, amistad y por haberme aceptado como su alumno y amigo, GRACIAS.

A mí comité de tesis: Dra. Adriana Muhlia, Dra. Gloria Yepiz, Dr. Luis Brieba y Dr. Jesús Hernández, por sus consejos, revisiones y disponibilidad a todo lo largo de la realización de este trabajo, GRACIAS.

A la Coordinación de Programas Académicos, en especial a las Dras. Gloria Yepiz y Ana María Calderón por su apoyo en el desarrollo de la tesis y mis estudios de posgrado.

A la M.C. Karina D. García Orozco, por su experiencia en bioquímica de proteínas e inmunoquímica, y a la M.C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte por su apoyo y enseñanzas en biología molecular. A la Q.B. Sandra Araujo Bernal por su apoyo técnico durante las determinaciones de expresión génica de PCNA. A la M.C. Mariana Rodríguez Armenta por su apoyo técnico en herramientas de biología molecular. A la Q.B. Mónica Reséndiz por su apoyo técnico en técnicas inmunoquímicas. Al M.C. Emmanuel Aispuro Hernández por su apoyo técnico en técnicas bioquímicas de purificación de proteínas.

Al Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora, Campus Hermosillo, por el uso y apoyo para la modelación molecular de la ADN polimerasa del WSSV y PCNA de camarón.

Al Sr. Gerardo Reyna Cañez por su apoyo técnico en biblioteconomía y referencias bibliográficas. A los Ing. Felipe Isac Martínez, Juan Martín Peralta C., Luis Alonso Leyva Duran, Karla Robles Bernal por su apoyo técnico en computo (software, hardware y redes e internet).

Al mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos Alonso, Karina, Eduardo, Idania, Salvador, Oliviart, Laura, Carlos, Manolo, Sandra, Analía, si me hizo falta alguien no es porque no lo quiera, pero también gracias.

A mis amigos Alberto, Jorge, Jandy, María Luisa, Zaira, Santy, Minerva, Alonso, Fernando, Gaby, Enrique, Karina y Chapo.

A mi Familia Enrique, Bertha María, Armando, Guillermo, Sandra, Armida y Samantha. Por su apoyo Gracias.

A mi nueva Familia Rodríguez Armenta, Sr. Oscar Javier, Sra. Candy, Mariana, Oscar Javier, Omar Alberto, Geisol y por supuesto Geisolita, Gracias a todos.

Gracias a todos aquellos que por el momento se me olvidan.....

DEDICATORIA

A Mi familia Mariana, mi esposa, compañera, mi inspiración y motivación, por ayudarme a ser lo que ahora soy, por estar en los buenos y malos momentos, por estar siempre junto a mi T.A.M. Sin ti esto no hubiera sido lo mismo GRACIAS.

A Mis Padres Enrique y Bertha María porque siempre están al pendiente por apoyarme en todas las cosas.

A Mis hermanos y compañeros de toda la vida Guillermo, Armando y Sandra, porque siempre están y estarán a mi lado.

A Dios gracias por darme vida para terminar esta etapa y darme tiempo de empezar otras más.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xi
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	5
II.1. Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV)	5
II.1.1. Importancia en la Camaronicultura	5
II.1.2. Características y genes del WSSV	5
II.2. ADN polimerasa	7
II.2.1 Estructura y función de las ADN polimerasas	7
II.2.2. Familia B	9
II.3. Análogos Nucleosídicos (AN)	12
II.3.1. AN fosforilados y no fosforilados	12
II.3.2. Mecanismo de acción de los AN	14
II.3.3. Ejemplos de aplicaciones de AN en enfermedades virales	16
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. HIPÓTESIS	19
V. OBJETIVO GENERAL	19
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	19
VII. METODOLOGÍA	20
VII.1. Reactivos y Materiales	20
VII.2. Construcción del Sistema Heterólogo WSSV ADN pol	20
VII.2.1. ADN viral y amplificación por PCR del gen de WSSV ADN pol	20
VII.2.2. Clonación de la WSSV ADN pol	22
VII.3. Sobreexpresión heteróloga de la WSSV ADN pol	23
VII.4. Purificación de la WSSV ADN pol recombinante	23

VII.5. Determinación de la actividad enzimática de la WSSV ADN pol	24
VII.6. Modelación molecular de la WSSV ADN pol codificada por el ORF514	26
VII.7. Caracterización <i>Lv</i> PCNA	27
VII.7.1. Secuenciación y Caracterización del ADNc del PCNA	27
VII.7.2. Obtención y amplificación del ADNc de PCNA (<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>)	27
VII.7.3. Modelación molecular del <i>Lv</i> PCNA	28
VII.8. Expresión del <i>Lv</i> PCNA y WSSV ADNpol en tejido de camarón por qRT-PCR	29
VII.9. Análisis y Secuenciación de WSSV ADN pol y <i>Lv</i> PCNA	31
VIII. RESULTADOS y DISCUSIÓN	32
VIII.1. Caracterización de la WSSV ADN polimerasa	32
VIII.2. Caracterización del PCNA de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>	40
IX. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES	49
X. REFERENCIAS	50
ANEXOS	55
ANEXO I. Enrique de-la-Re-Vega, Karina D. Garcia-Orozco, Aldo A. Arvizu-Flores, Gloria Yepiz-Plascencia, Adriana Muhlia-Almazan, Jesús Hernández, Luis G. Briebe, Rogerio R. Sotelo-Mundo. <i>Molecules</i> 2011 , <i>16</i> , 532-542; doi:10.3390/molecules16010532	55
ANEXO II. Enrique de-la-Re-Vega, Adriana T. Muhlia-Almazan, Aldo A. Arvizu-Flores, Maria A. Islas-Osuna, Gloria Yepiz-Plascencia, Luis G. Briebe, Rogerio R. Sotelo-Mundo (2011) Molecular Modeling and Expression of the <i>Litopenaeus vanammei</i> Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) after White Spot Syndrome Virus Shrimp Infection. En revision en la revista “Fish and Shellfish Immunology”.	66

LISTA DE FIGURAS

1. Estructura del WSSV obtenida por microscopía inmunoelectrónica	6
2. Proteínas involucradas en la síntesis de ADN	7
3. Características del subdomino de las polimerasas	8
4. Representación en listones de la proteína del RB69	10
5. Construcción filogenética de las polimerasas de la familia B	11
6. Diferencias en el acomodo de los 7 dominios polimerasa	12
7. Estructuras de AN y el análogo con el cual compite en la replicación	13
8. Mecanismo de acción de aciclovir, un análogo no fosforilado	15
9. Mecanismo de acción de Cidofovir	16
10. Amplificación de una región interna del ORF514 que contiene el dominio polimerasa	33
11. Sobreexpresión recombinante de la WSSV ADN polimerasa	34
12. Purificación de la ADN polimerasa viral	35
13. Efecto de la temperatura en la actividad de la WSSV ADN polimerasa	36
14. Diagrama general de actividad de polimerasa	36
15. Actividad polimerasa de la proteína recombinante WSSV ADN pol	37
16. Modelo molecular de la WSSV ADN polimerasa	38
17. Aminoácidos invariantes, involucrados en la interacción con el ADN	39
18. Modelo propuesta de la unión del ADN a la polimerasa	39
19. Secuencia completa de nucleótidos y aminoácidos del <i>Lv</i> PCNA	42
20. Alineamiento múltiple de la secuencia deducida de aminoácidos del <i>Lv</i> PCNA con otros PCNA	44
21. Modelación molecular de <i>Lv</i> PCNA	46
22. Expresión relativa del ARNm de <i>Lv</i> PCNA en diferentes tejidos del camarón	47
23. Expresión relativa del ARNm de <i>Lv</i> PCNA y ADN pol viral en camarones infectados con el WSSV	48

LISTA DE TABLAS

1. Oligonucleótidos utilizados para la clonación del gen de la WSSV ADN polimerasa	21
2. Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de actividad de polimerasa	26
3. Iniciadores utilizados para obtener y amplificar el gen del PCNA (<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>)	29
4. Iniciadores utilizados para la expresión de los genes del LvPCNA (<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>) y WSSV ADN polimerasa	30

RESUMEN

El virus de la mancha blanca (WSSV) es uno de los virus más letales que afectan la camaronicultura, ya que puede causar el 100% de mortalidad en solo unas horas en un estanque. Este virus no solo infecta al camarón sino a un gran número de especies de crustáceos, por eso de la importancia del estudio de su genoma. El marco de lectura (ORF) 514 se había reportado, hasta la realización de este trabajo, como un ORF “*putativo*” codificante de una ADN polimerasa viral. Este tipo de proteínas involucradas en la replicación del ADN se han vuelto blanco de fármacos antivirales, por lo que es de gran importancia su caracterización, ya que conociendo su función se pudieran realizar trabajos con el objetivo de inhibir la replicación viral. En este trabajo se realizó la caracterización del ORF514, así como el estudio de una proteína accesoria en la replicación, el PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) de *Litopenaeus vannamei*. El PCNA esta reportado que confiere una mayor procesividad a las polimerasas durante la replicación del ADN. En este trabajo de tesis se encontró que el marco de lectura 514 tiene actividad de polimerasa ya que incorporo nucleótidos a una cadena molde de ADN. Así mismo, se identificaron los dominios *polimerasa* y *exonucleasa*, así como los sub dominios de los dedos, pulgar y palma de acuerdo a una modelación molecular predictivo. Este trabajo incluye la caracterización del ADNc de PCNA de camarón y su expresión génica durante una infección del camarón con el WSSV. Se caracterizó la secuencia completa codificante del PCNA y se identificaron los dominios involucrados en la interacción PCNA/ADN/ADN polimerasa en el modelo molecular teórico. Adicionalmente, se cuantificaron los niveles de ARNm de los genes de PCNA y de la WSSV ADN polimerasa, mediante la transcripción reversa y PCR cuantitativo (qRT-PCR), se pudo observar que el gen de la WSSV ADN polimerasa aumenta su expresión conforme aumenta la infección, mientras que el PCNA mantiene su expresión a lo largo de la

infección viral. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo en donde se identificó la actividad de polimerasa del ORF514, se pudiera dirigir algún tipo de inhibición hacia esta enzima, dado que se pudo identificar su actividad y su expresión a lo largo de una infección con el WSSV.

I. INTRODUCCIÓN

Se conocen más de 20 virus que atacan a los crustáceos (Flegel 2006). Uno de éstos es el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés *white spot syndrome virus*¹), agente causal del síndrome del mismo nombre. El WSSV no solo puede infectar al camarón, si no también puede infectar a una gran variedad de crustáceos como cangrejos y langostinos. Por su importancia económica, se ha estudiado la interacción de este virus con el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Los camarones infectados con el WSSV presentan letargia, un hepatopáncreas rojizo y algunos pueden presentar manchas blancas de carbonato de calcio en el cefalotórax, de ahí el nombre de “mancha blanca” (van Hulten *et al.*, 2000). Esta enfermedad tiene un alto costo sobre la producción de camarón en estanques a nivel mundial.

El WSSV se encuentra clasificado dentro de una nueva familia de virus denominada *Nimaviridae*, que incluye al género *Whispovirus* (van Hulten *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009). Este virus posee una cápside y su genoma es circular de doble cadena de ADN. El genoma consiste en 305 Kb y cuenta con aproximadamente 180 marcos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés *open reading frame*) (Bustillo-Ruiz *et al.*, 2009; Sánchez-Paz 2010). El ORF 514 codifica a una proteína similar a una ADN polimerasa (GenBank AAK77696), la cual se asume que esta implicada en la replicación del ADN viral (van Hulten *et al.*, 2001). De acuerdo a lo anterior, en este estudio se planteo el estudio del ORF 514 basado en el amplio conocimiento de las ADN polimerasas (ADN pol) en diversos organismos. El conocimiento sobre estas enzimas abarca muchas décadas de trabajos bioquímicos, moleculares, y se han elucidado los componentes de la

¹ Las abreviaturas comúnmente usadas de los términos en inglés (PCR, ORF, WSSV) una vez definidos y traducidos, se usan en el texto con las iniciales del término en idioma inglés.

replicación viral a detalle, siendo un ejemplo de esto la ADN pol del bacteriófago T7 (Brieba *et al.*, 2004).

Actualmente, el conocimiento de la replicación de los herpes virus ha permitido identificar moléculas que tienen actividad antiviral, algunas de las cuales se han desarrollado como fármacos (De Clercq y Holý 2005). Su mecanismo se basa en la inhibición diferencial de una enzima viral, sin afectar a la contraparte del hospedero (Roth 1986). Entre los fármacos del tipo nucleosídico se encuentra el aciclovir y el ganciclovir, que son ampliamente utilizados contra virus tales como el herpes virus (HSV) y el virus de la varicela zoster (VZV) (Mul *et al.*, 1989).

La sobreexpresión recombinante, es una técnica importante en estudios donde se busca entender la relación entre la estructura, la función y el diseño de inhibidores selectivos para proteínas, o bien, para ingeniería de las mismas. Puesto que se conoce la secuencia nucleotídica de la ADN pol del WSSV, es factible su sobreexpresión en un sistema heterólogo procarionte con la finalidad de tener cantidades abundantes de enzima para su caracterización bioquímica. Por lo tanto, en este trabajo se espera aportar nueva información, tanto de la estructura como de la funcionalidad de la ADN pol del WSSV. El conocimiento de su función e interacción con inhibidores sería de gran ayuda para la producción de algún fármaco, que permita combatir la enfermedad de la mancha blanca en el camarón.

II. ANTECEDENTES

II.1. Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV)

II.1.1. Importancia en la Camaronicultura. El WSSV es el agente causal del síndrome de la mancha blanca en el camarón. Este virus se ha aislado en tres regiones geográficas diferentes, Tailandia, China y Taiwán, presentado diferencias en su genoma, así como en su patogenicidad y capacidad de infección (Flegel 1997; Sánchez Martínez *et al.*, 2007). El aislado Tailandés ha mostrado ser el más virulento, ya que puede causar el 50% de mortalidad en un estanque en solo 2 días, mientras que para los aislados de China y Taiwán la mortalidad se registra entre 3 y 10 días (van Hulten *et al.*, 2001).

La transmisión del WSSV involucra a varios vectores tales como cangrejos, langostas y una amplia variedad de peneidos (Dieu *et al.*, 2010). Los camarones infectados presentan síntomas tales como letargia, nado errático, pleópodos y urópodos rojizos. Una característica específica de la infección, es la aparición de agregados de carbonato de calcio en el exoesqueleto (Dieu *et al.*, 2004). El WSSV no solo se ha encontrado en organismos vivos, sino que se ha detectado en productos congelados de camarón, así como en suelos de granjas que presentaron la infección (Nunan *et al.*, 1998; Natividad *et al.*, 2008).

II.1.2. Características y genes del WSSV. Los viriones del WSSV son de un tamaño aproximado de 275 x 120 nm, dcon forma baciliforme y en uno de sus extremos se encuentra un apéndice (Figura 1), por lo que se le incluye dentro de la nueva familia *Nimaviridae*. El WSSV tiene una nucleocápside que le da protección y forma que se encarga del reconocimiento hospedero-virus, ya que está recubierta por proteínas de reconocimiento (van Hulten *et al.*, 2001). Por la forma de la nucleocápside, al WSSV se le clasifica como baculovirus, aunque el tamaño de su genoma de 305 kb, no se encuentra dentro del rango de ADN de los baculovirus. Por ello para clasificarlo se creó un nuevo género, el *Whispovirus* (Tang *et al.*, 2007).

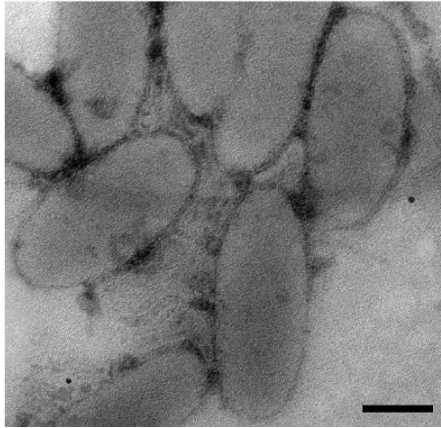


Figura 1.- Estructura del WSSV obtenida por microscopía inmunoeléctronica (Wu y Yang 2006). Viriones intactos vistos utilizando la metodología IEM (*immunolectron microscopy*, por sus siglas en inglés)

Debido al gran tamaño del genoma del WSSV, sólo el 5% de las secuencias obtenidas de este virus han sido estudiadas, y la mayoría son proteínas de reconocimiento e interacción entre el hospedero y el virus. Los genes del genoma de WSSV se pueden clasificar en cuatro grupos, el primero compuesto por genes estructurales tales como VP22 y VP28 (Yi *et al.*, 2004), los cuales codifican a proteínas de la nucleocápside. El segundo grupo está compuesto por genes funcionales como las proteínas VP60A y VP53A, involucrados en la proliferación y el ciclo de vida del virus (Tsai *et al.*, 2004). El tercer grupo está compuesto por genes involucrados en la latencia del virus, proceso que es activamente investigado pero poco clara su función. El cuarto y último grupo son genes temporales los cuales están involucrados en la replicación del ADN viral, un ejemplo es la proteína cinasa (*Pk*), también las proteínas ADN polimerasa, TS (timidilato cinasa), TK-TMK (timidino cinasa-timidino monofosfato cinasa), ésta última es una quimera que solo existe en el WSSV, la cual está involucrada en el ciclo de replicación del virus (Liu *et al.*, 2001; Sánchez Martínez *et al.*, 2007). Dentro del cuarto grupo se encuentra el ORF 514, uno de los más importantes en el virus, ya que codifica para una ADN polimerasa, para la que aún no se ha demostrado su función (Chen *et al.*, 2002).

II.2. ADN Polimerasa

II.2.1 Estructura y Función de las ADN Polimerasas. La ADN pol es la enzima encargada de sintetizar una nueva cadena de ADN a partir de una cadena molde o templado (Alberts *et al.*, 2002). El proceso de síntesis de ADN es complicado y los principales actores son las proteínas de reconocimiento, las cuales se unen a una secuencia llamada origen de replicación. Este sitio es variable dependiendo si la replicación es en organismos procariontes, eucariontes o virus. El complejo de replicación consiste de varias proteínas también llamado replisoma, formado por una proteína de reconocimiento del origen de replicación (OriB) la helicasa (DnaB), topoisomerasa I, primasa (DnaG), las proteínas de unión a la cadena sencilla SSB (*single-stranded binding proteins*, por sus siglas en inglés), ligasa, la pinza (β) y la ADN polimerasa III, (Figura 2) (Alberts *et al.*, 2002; Johnson y O'Donnell 2005a).

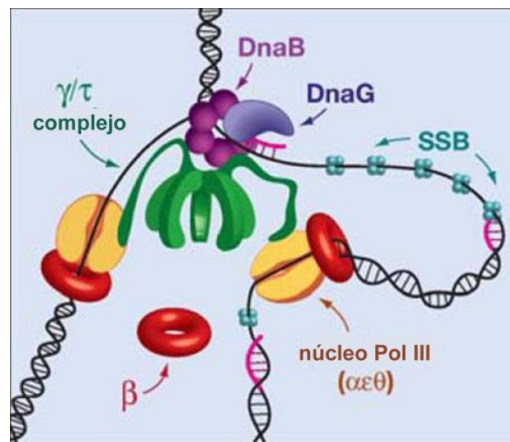


Figura 2.- Proteínas involucradas en la síntesis de ADN (Johnson y O'Donnell 2005a). Complejo enzimático donde se pueden identificar el PCNA o pinza β y la polimerasa Pol III.

Cada una de estas proteínas tiene una función específica dentro de la síntesis de ADN. Las proteínas iniciadoras reconocen la secuencia del origen de la replicación, y permiten la unión de la helicasa, que va abriendo la doble hélice del ADN rompiendo los puentes de hidrógeno entre las cadenas (Johnson y O'Donnell 2005a). La topoisomerasa evita el superenrollamiento, por medio del rompimiento de los enlaces fosfodiéster. Las

SSB evitan que la cadena sencilla vuelva a unirse a la cadena complementaria y las Primasas son las encargadas de sintetizar el iniciador, el cual reconocerá la polimerasa y se dará la síntesis del ADN. A su vez a la polimerasa la reconocerá la proteína “pinza” (β), ésta le conferirá el anclaje a la cadena de ADN, para así darle lugar a la ligasa la cual unirá los fragmentos de Okasaki formados durante la síntesis de la cadena “retrasada” (Johnson y O'Donnell 2005a). La enzima mas importante en la síntesis de ADN es la polimerasa, que polimeriza los nucleótidos usando como modelo la cadena molde complementaria, donde ya se encuentran todas las demás proteínas (Kornberg 1984).

Las polimerasas también tienen funciones de reparación, tales como la reparación de nucleótidos excluidos y la excisión de bases, entre otras. Todos los procesos en los cuales las polimerasas se ven involucrados, están relacionados con la preservación del ADN del organismo (Bebenek y Kunkel 2004). Las familias de polimerasas difieren en su subunidad catalítica, pero todas tienen tres partes en común ubicadas en el subdominio de la subunidad catalítica, comúnmente llamadas dedos, palma y pulgares (Figura 3) (Bebenek y Kunkel 2004).

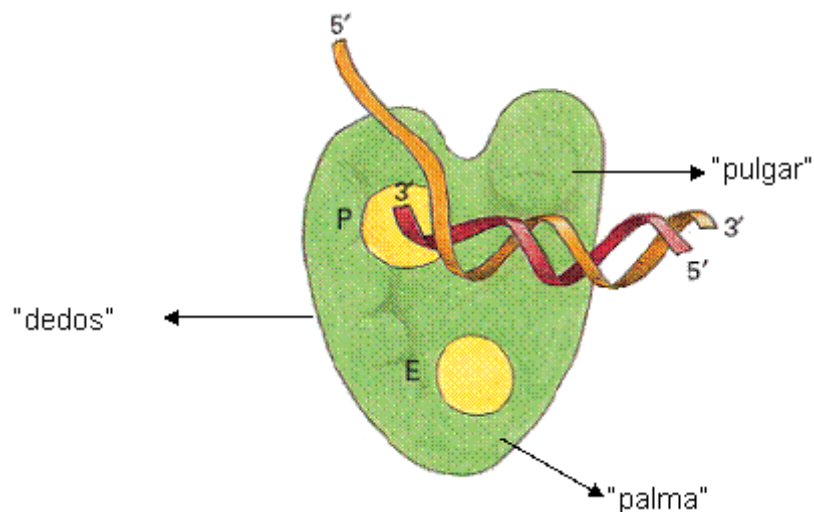


Figura 3.- Características del subdominio de las polimerasas (Johnson y O'Donnell 2005a). Se identifican los subdominos de los dedos, pulgar y palma.

Basadas en las diferencias dentro de la estructura primaria de su subunidad catalítica, las ADN pol se pueden clasificar en distintas familias. Se han encontrado 5 polimerasas en *Escherichia coli*, nueve en *Saccharomyces cerevisiae* y 16 en el humano.

Las familias se clasifican de acuerdo al gen que codifican y cuál es el organismo donde inicialmente las identificaron. La familia A por la *E. coli polA*, por el gen que codifica para la polimerasa I. En esta familia se encuentra la T7 polimerasa del bacteriófago T7. Dentro de la familia B se incluye a la polimerasa II, codificada por el gen *polB*. Además existe la familia C, en la cual se encuentra la pol III, cuya subunidad catalítica es codificada por el gen *polC (dnaE)*. En la familia D están los heterodímeros de la pol II, y la familia X incluye a la bien conocida pol β de mamíferos. Recientemente se ha descrito la familia Y, la cual incluye a las enzimas pol IV y pol V entre otras (Bebenek y Kunkel 2004).

II.2.2 Familia B. La primera actividad de ADN polimerasa fue identificada en 1956 en la bacteria *E. coli* (Kornberg 1984). La enzima fue nombrada subsecuentemente ADN polimerasa I (pol I). Pol I es una enzima de 109 kDa, soporta una arquitectura de multi-dominios, los cuales le confieren actividad polimerasa y actividad 5'-3' y 3'-5' exonucleasa. Esta enzima fue la precursora de todas las polimerasas, siendo ésta la primera en ser cristalizada. De ahí que se pudieran clasificar las diferentes familias basándose en los aminoácidos catalíticos encontrados en el subdomino de la “palma” (Rothwell y Waksman 2005).

En la familia “B” en la cual se encuentran clasificadas las polimerasas de eucariontes α, δ, ϵ , las polimerasas virales como la del virus del herpes simple HSV (Boehmer y Lehman 1997). Así como las polimerasas de plásmidos y bacteriófagos como el T4, RB69 y $\phi 29$ (Brautigam y Steitz 1998; Berman *et al.*, 2007). Esta familia está predominantemente relacionada con la replicación del ADN y la de cromosomas en la división celular en eucariontes. Asimismo juega un papel importante en la reparación de errores del ADN, ya que cuenta con una actividad 3'-5' exonucleasa, 1000 veces más alta que la pol I de *E. coli* (Rothwell y Waksman 2005).

Las polimerasas tienen sus residuos catalíticos en el subdominio de la “palma”, que son universalmente conservados y corresponden a dos residuos de aspartato, que junto con los dNTP's (deoxi-ribo-nucleotidos), unen dos iones divalentes de magnesio Mg^{+2} que catalizan la reacción de polimerización (Brautigam y Steitz 1998; Rothwell y

Waksman 2005). Una cualidad interesante y que hace que la polimerasa α y la pol I sean diferentes, es que el dominio que contiene la actividad exonucleasa se encuentra a un lado del subdominio de la “palma”, para la pol I, mientras que para la polimerasa α esta al lado opuesto del subdominio (Figura 4) (Franklin *et al.*, 2001). De la misma forma se puede ver un acomodo diferente de los subdominios “palma”, “dedos” y “pulgar”.

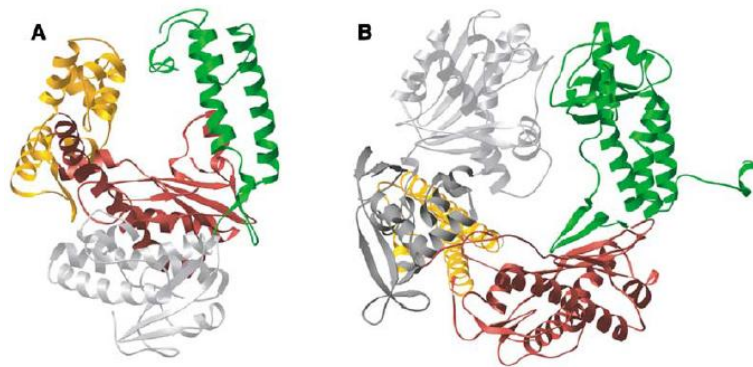


Figura 4.-Representación en listones de la proteína del RB69. “dedos”, “palma”, “pulgar”, están dados por los colores amarillo, rojo y verde respectivamente. (A) polimerasa Klenow (familia A). (B) polimerasa RB69. En gris y plata se ilustra el dominio 3'-5' exonucleasa y N-terminal respectivamente (Rothwell y Waksman 2005).

En el 2001 van Hulten realizó un análisis de la secuencia del WSSV y encontró un ORF que contiene una región desde los aminoácidos 628 a 805 que corresponden a un dominio de exonucleasa similar a las ADN polimerasas familia B. Al realizar un análisis tipo BLAST iterativo (Psi-BLAST), se encontró que la secuencia del WSSV ORF 514 presenta similitud a la polimerasa del herpesvirus humano U38 con 16% de identidad. También tiene semejanza con la de citomegalovirus con 14% de identidad y con la subunidad delta de la ADN polimerasa III de la levadura *S. cerevisiae* con 15% de identidad. Estas polimerasas son de las más estudiadas, ya que se conoce su estructura terciaria, los aminoácidos de su sitio catalítico y su actividad (Boehmer y Lehman 1997).

A la polimerasa de WSSV se le dió el nombre de “putativa”, ya que no se había demostrado experimentalmente su actividad, sino sólo la similitud de la secuencia deducida de aminoácidos de su expresión (nivel de ARN). Chen *et.,al.* (2002), realizaron un análisis de la expresión y filogenético de la ADN polimerasa de WSSV y encontró

tanto el mensaje de la enzima en camarones infectados, como la diferencia de ésta con las demás polimerasas de la misma familia B. Como se puede ver en la Figura 5, manteniendo las características que la hacen estar dentro de un nuevo género y familia, la polimerasa del WSSV cae fuera de las demás clases de polimerasas. Chen *et. al.* (2002) en ese mismo estudio reportó diferencias en el tamaño, secuencia y organización de los 7 dominios polimerasa (Figura 6). Las diferencias son en base a el orden de los dominios dentro del gen de la polimerasa, ya que los dominios *per se* están conservados en todas las polimerasas.

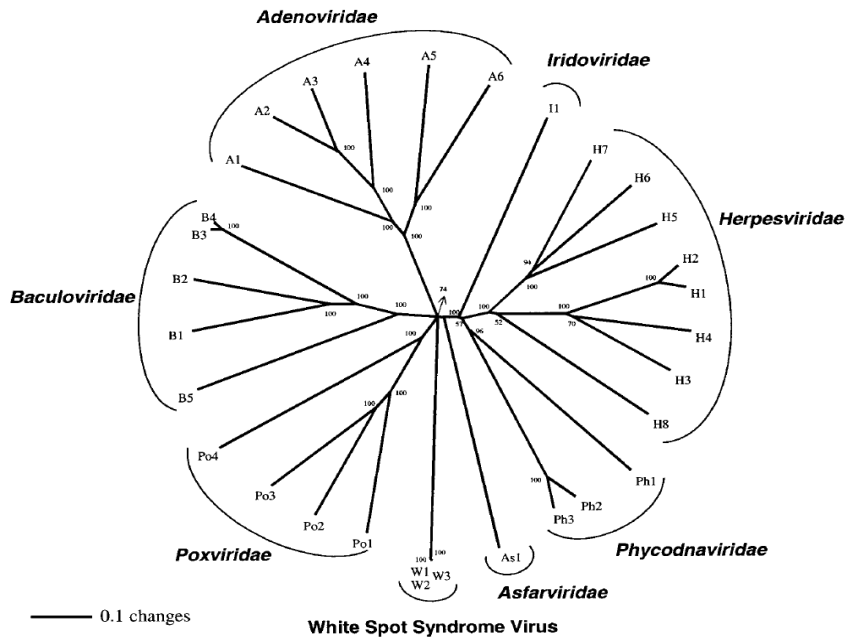


Figura 5.- Construcción filogenética de las polimerasas de la familia B (Chen *et al.*, 2002).

Es muy interesante considerar cambios en las regiones espaciadoras entre los dominios conservados que tiene la ADN pol del WSSV. De la misma forma, esta enzima podría tener una estructura secundaria muy diferente a las polimerasas ya estudiadas. Pudiendo tener una diferente conformación de su sitio catalítico y un diferente acomodo de sus hélices alfa y beta plegados, dándole alguna de las características ya antes mencionadas como ser resistente o más susceptible. Por lo anterior interesante encontrar

algún inhibidor de la ADN pol de WSSV así como su estructura secundaria, como potencial fármaco antiviral.

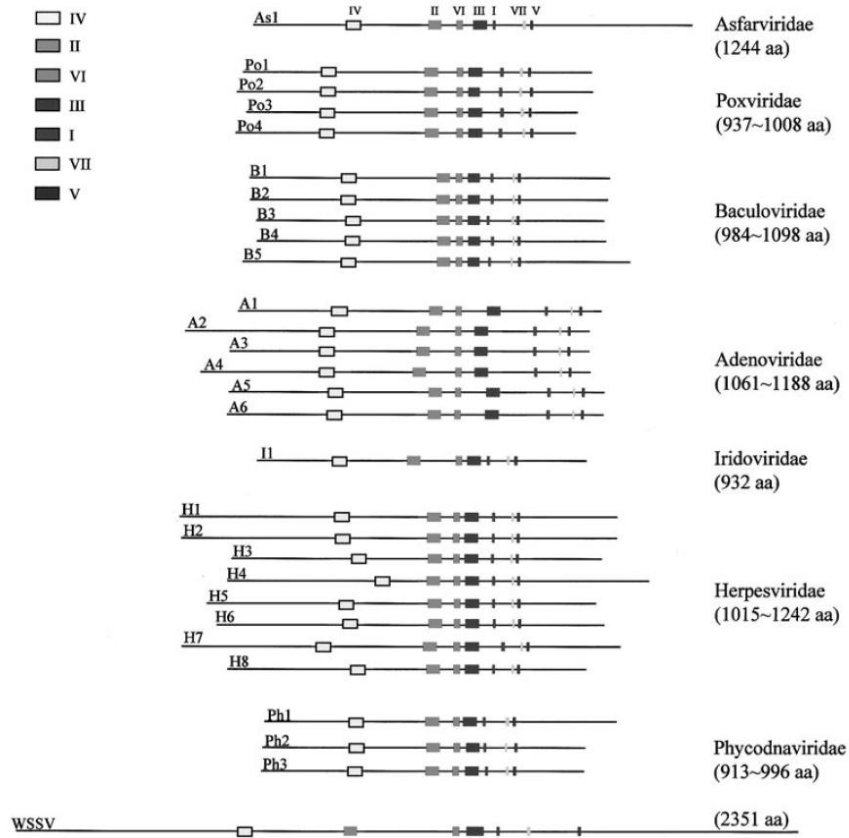


Figura 6.- Diferencias en la organización de los 7 dominios polimerasa. Se muestran las diferencias en tamaño y el orden de las dichos dominios (Chen *et al.*, 2002).

II.3. Análogos Nucleosídicos (AN)

II.3.1. AN Fosforilados y No Fosforilados. En los años 60s los derivados nucleosídicos fueron identificados como moléculas que podrían jugar un papel importante en la batería de fármacos disponibles para el tratamiento del cáncer (Mul *et al.*, 1989). Se creía que éstos eran anti-metabolitos que podrían interferir con el crecimiento de tumores, ya que funcionan como terminadores de la replicación del ADN.

Durante las pasadas dos décadas, las drogas o fármacos antivirales se han vuelto cruciales en el combate de varias infecciones virales, tales como el virus del herpes (HSV), virus de la inmunodeficiencia humano (HIV) y de la hepatitis B (HBV). Entre este tipo de drogas, sobresalen los análogos nucleosídicos (AN), los cuales actúan como potentes agentes antivirales, teniendo su actividad dirigida hacia la ADN polimerasa del virus (De Clercq 2003a).

Los AN pueden encontrarse de dos formas, fosforilados y no fosforilados. Los AN no fosforilados fueron los primeros en atender la necesidad de antivirales. El DHPA (S)-9-(2,3-dihidroxipropilo) adenina, es un análogo del nucleótido adenina, el cual es el AN no fosforilado más utilizado en la actualidad. DHPA ha servido como precursor para las demás generaciones de AN sintetizados hoy en día. Un ejemplo de esta nueva generación es el Aciclovir, análogo del nucleótido guanosina (Figura 7), que ha sido utilizado para combatir la enfermedad causada por el virus del herpes HSV tanto tipo 1 como tipo 2 (De Clercq 2003a).

El cidofovir es otro tipo de AN que a diferencia de DHPA y de aciclovir es fosforilado, como se puede ver en la Figura 7 este AN tiene un grupo fosfato en su cadena lateral, este grupo le confiere mas estabilidad y disponibilidad al momento de entrar en competencia con su análogo nucleotídico citocina (De Clercq 2003b).

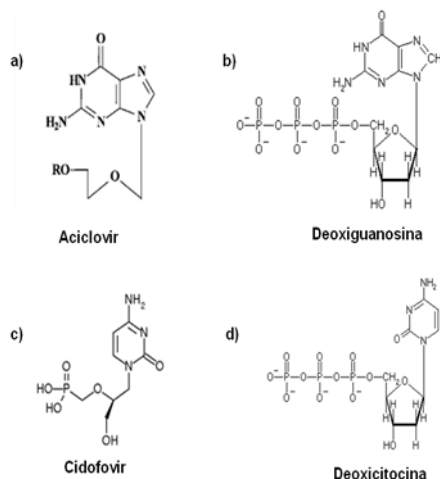


Figura 7.- Estructuras de AN y el análogo con el cual compite en la replicación. A) Aciclovir AN no fosforilado. B) Nucleótido deoxiguanosina. C) Fármaco cidofovir AN fosforilado. D) nucleótido deoxicitocina (De Clercq 2003a).

II.3.2 Mecanismo de Acción de los AN. El mecanismo de acción de los análogos nucleosídicos es funcionar como terminadores de la replicación del ADN viral, específicamente están dirigidos hacia la ADN polimerasa del virus (De Clercq y Holý 2005). Para poder funcionar como terminadores estos fármacos primeramente deben ser monofosforilados por la timidilato cinasa (Tk) del virus (esto para AN no fosforilados), dicho paso es selectivo, ya que la Tk puede que no se encuentre disponible o que el virus produzca muy poca cantidad de esta enzima. En el momento en que el AN es monofosforilado los siguientes pasos son ser di- y tri- fosforilados por las cinasas del organismo infectado. Estos pasos ya no son selectivos, debido a que las enzimas que realizan la acción de fosforilación son disponibles para realizar este proceso. Al momento de que son tri fosforilados, los AN entran a una reacción competitiva ya que compiten con los nucleótidos del organismo para entrar a la reacción de polimerización del nucleótido o el análogo al ADN (De Clercq y Holý 2005; Öberg 2006), (Figura 8).

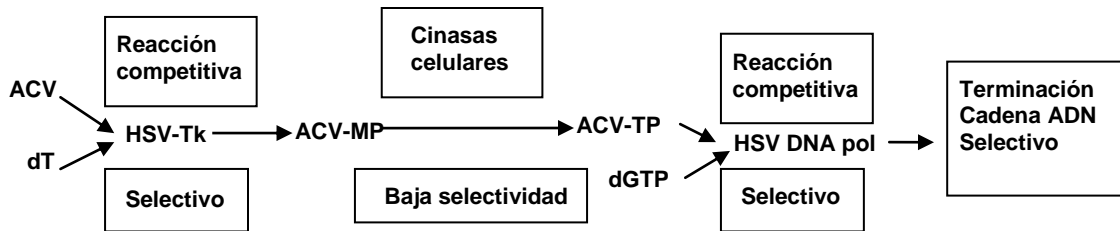


Figura 8.- Mecanismo de acción de aciclovir, un análogo no fosforilado (Oberg, 2006).

Un problema que presentan los AN no fosforilados es el primer paso de fosforilación ya que como se había mencionado hay virus que no tienen la Tk y por ende no ocurre la monofosforilación y el resultado de esto es que el fármaco no funciona como terminador. Este problema se solucionó con la aparición de los AN fosforilados ya que la ventaja en el uso de este tipo de fármaco radica en que el primer paso de fosforilación competitivo ocurre, este AN pasa directo a ser di- y tri- fosforilado por las cinasas del organismo huésped (De Clercq 2007)(Figura 9).

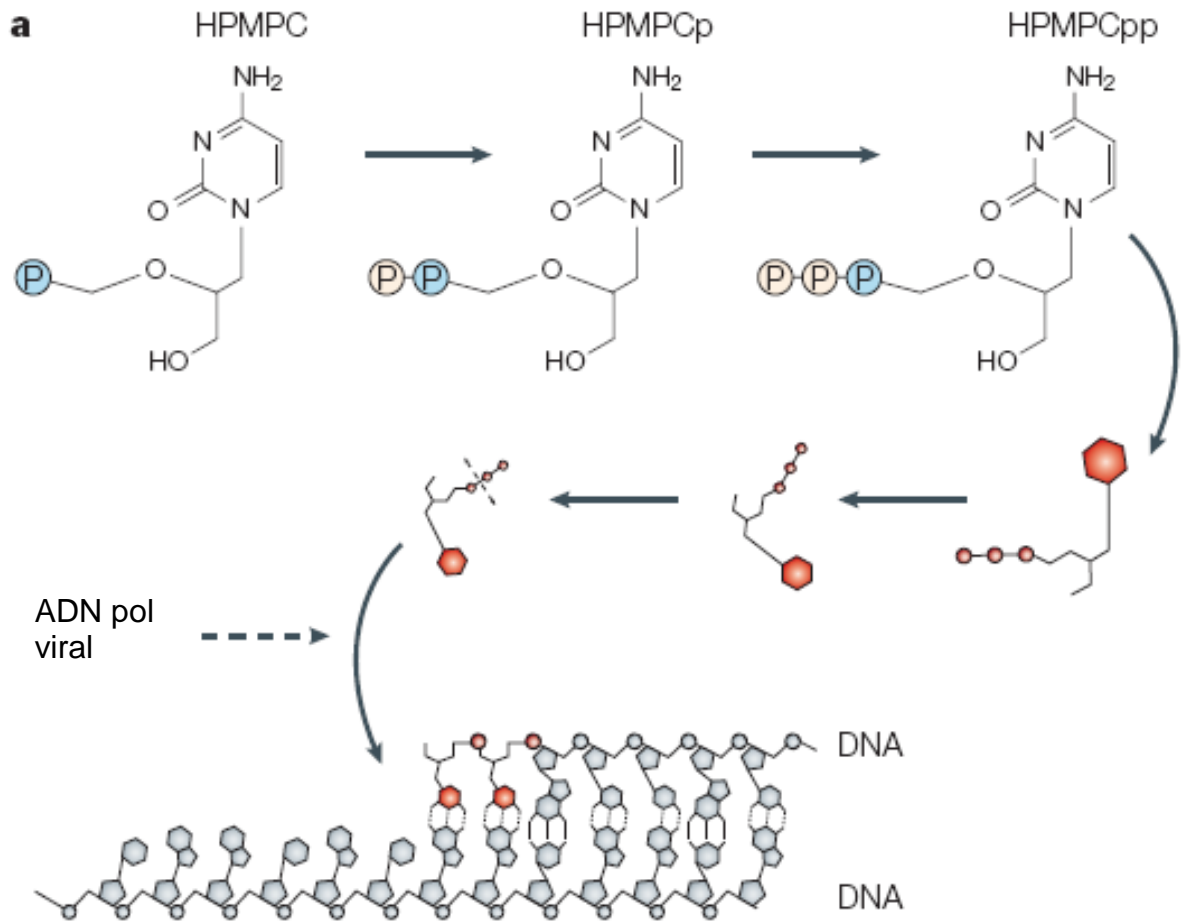


Figura 9.- Mecanismo de acción de Cidofovir (de Clercq 2005).

II.3.3 Ejemplos de aplicaciones de AN en enfermedades virales. En la bibliografía hay varios ejemplos del uso de AN en diferentes enfermedades virales tales como el papilomavirus, el cual es tratado con el fármaco cidofovir, el uso de este fármaco lleva a la eliminación de la enfermedad. Esto se puede atribuir a que cidofovir induce a apoptosis en las células infectadas (De Clercq 2003a).

Infecciones por herpesvirus tipo 1 y 2, se tratan con aciclovir, pero por disponibilidad de la Tk viral, el virus puede llegar a crear resistencia al fármaco. Por lo que nuevas alternativas han surgido, un ejemplo de este tipo de drogas son las que tienen

como blanco el complejo helicasa-primasa, el cual esta involucrado en el desenrollamiento y generación de iniciadores (De Clercq 2007).

Estos son ejemplos fármacos tipo AN que funcionan contra enfermedades virales, como se puede ver no todos tienen su acción sobre la ADN polimerasa, lo que hace que el estudio de este tipo de drogas dirigidas a las diferentes proteínas involucradas en la replicación viral sea importante.

III. JUSTIFICACIÓN

Dada la poca información que se tiene a cerca de la ADN polimerasa del virus de la mancha blanca, es de gran importancia la información que este trabajo aporta, con los estudios de bioquímica y estructura. La similitud con las polimerasas de la familia B, permitirá aplicar metodologías y estrategias para evaluar su actividad, procesividad.

De la misma forma el trabajo de inhibición utilizando inhibidores nucleosídicos, ha sido ampliamente estudiado en trabajos con virus de importancia para organismos vertebrados. También se sabe que este virus tiene una gran importancia en la camaronicultura ya que genera una gran mortalidad y por ende una gran pérdida económica. Por lo que sería de gran importancia encontrar algún fármaco que pudiera ayudar a inhibir la replicación del virus.

IV. HIPÓTESIS

La proteína codificada en el ORF514 del genoma del virus del síndrome de la mancha blanca es funcionalmente una ADN polimerasa capaz de sintetizar ADN utilizando una cadena molde o templado e identificar una proteína accesoria para la replicación del ADN ya sea de origen viral o del hospedero.

V. OBJETIVO GENERAL

Obtener la proteína recombinante codificada en el ORF514 del virus del WSSV y demostrar su actividad, así como identificar una proteína accesoria de la replicación del huésped.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Sobreexpresar y purificar la ADN pol WSSV en un sistema heterólogo procarionte.
- Evaluar la actividad enzimática de la ADN pol WSSV mediante ensayos de replicación *in vitro*.
- Identificar el cDNA de la proteína PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) del camarón como un factor accesorio de la replicación viral.

VII. METODOLOGÍA

VII.1 Reactivos y Materiales

Los reactivos utilizados fueron grado analítico, bioquímico o grado biología molecular según fue requerida. Los iniciadores para amplificación por PCR del ADN viral y las sondas moleculares (*molecular beacons*) para evaluar la actividad de la WSSV ADN pol fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies). La ADN polimerasa de alta fidelidad (*Pfu turbo*) fue obtenida de Invitrogen, así como las enzimas de restricción. Se utilizó un juego de reactivos para amplificación de extremos de ADN (*DNA walking*) para la obtención del gen completo del PCNA, de la compañía Seegene (Seegene Corp, Rockville MD, EEUU). Las columnas utilizadas para los diferentes pasos de purificación fueron de GE Healthcare (Piscataway NJ, EEUU). La matriz fosfocelulosa P11 fue obtenida de Whatman (Clifton NY, EEUU).

VII.2 Construcción del Sistema Heterólogo WSSV ADN pol

VII.2.1 ADN Viral y Amplificación por PCR² del Gen de WSSV ADN Pol. La amplificación del gen de la ADN pol del virus de la mancha blanca se realizó utilizando ADN total aislado de camarones infectados con WSSV. Se diseñaron iniciadores que abarcaran los dominios polimerasa y exonucleasa. Este diseño se basó en el reporte que se tenía hasta el momento de Chen en el 2002 (Chen *et al.*, 2002).

Se diseñaron iniciadores específicos a partir de la secuencia nucleotídica reportada para WSSV ADN pol en el GenBank con número de acceso [AAK77696](#), los cuales se localizaron a los extremos de los dominios polimerasa y exonucleasa (van

² PCR, reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*.

Hulten *et al.*, 2001). Al iniciador sentido se le añadió el sitio de restricción para la enzima *SacI*, así como la secuencia 5' que codifica para los aminoácidos correspondientes a la proteína madura de la WSSV ADN pol. El iniciador antisentido se diseñó utilizando la secuencia codificante de los seis últimos aminoácidos, incluyendo el codón de terminación, y el sitio *NotI*, para favorecer la clonación direccional dentro del vector de expresión pET-28b (Novagen), a ambos iniciadores se le añadieron bases extra para una digestión adecuada del inserto, marcados como WSVpolFSac2 y WSVmpolRnot3. Para el PCR de colonia se diseñaron iniciadores dentro de la región codificante de la ADN polimerasa, nombrados WSV500fw y WSV500rv (Tabla 1).

La amplificación por PCR del gen de la WSSV ADN pol se llevo a cabo utilizando ADN total de camarón infectado como templado. La reacción de PCR se preparo mezclando 1 µL de ADN total, 1 U de *Pfu* polimerasa, 10 pmol de cada iniciador específico, 50 µM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂ en amortiguador 20 µM Tris-HCl, 50 µM KCl, pH 8.3. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes, 1 ciclo de 75°C, 10 min; 1 ciclo de 95°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C, 1 min, 52°C, 1 min, 72°C, 4 min; 1 ciclo de 72°C, 10 min. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, los cuales fueron visualizados utilizando SyBER SAFE y un transiluminador con luz UV.

Tabla 1.- Oligonucleótidos utilizados para la clonación del gen de la WSSV ADN polimerasa.

Nombre	Secuencia (5'-3')
WSVpolFSac2	C <u>GAGCTCATGGAGCGAGCTATAGGGCAG</u>
WSVmpolRnot 3	<u>ATAAGAATGCGGCCGCTAATCCCGTACACAAACAGAACCCAA</u> T
WSV500fw	CCTTTGTGACCCATCGACAA
WSV500rv	CTTGAGGCAGTATTGGCAGATCC

(En *cursiva* se denota la base extra en subrayado la secuencia que reconoce la enzima de restricción. Iniciadores utilizados para el PCR de colonia).

VII.2.2 Clonación de la WSSV ADN Pol. El producto de PCR de la WSSV ADN pol de aproximadamente 4 kb, fue digerido con enzimas de restricción, para comprobar que se trataba del gen de interés por el patrón de bandeado. Las enzimas de restricción que se utilizaron fueron: *EcoRI*, *NdeI*, *PvuII*, como sigue: Enzima, 5 U/ μ g de ADN, 1.5 Buffer 10X, ADN 500 ng en un volumen final de 15 μ L, la reacción se incubó 1 h a 37°C. Tanto el inserto como el vector de expresión pET-28b, se digirieron con las enzimas de restricción *SacI* y *NotI*. La elección de estos sitios de restricción fue debido a que el vector le añadiría una etiqueta de poli-histidina en el extremo N-terminal de la proteína recombinante, que facilitará su purificación por IMAC (por sus siglas en inglés *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*). Para la digestión del inserto y el vector con las enzimas de restricción se mezclaron: 10 U enzima, 1X Buffer 3, 1 μ g BSA (seroalbúmina bovina), 500 ng DNA (inserto o vector), las reacciones se incubaron 1 hr a 37°C. Entre cada reacción de digestión el inserto y el vector se purificaron utilizando columnas QIAex (GE Health Care), para remover la enzima de restricción y las sales. Para evitar la recircularización del vector este se defosforiló utilizando la enzima SAP (*shrimp alkaline phosphatase* por sus siglas en inglés), mezclando 14 pmoles, 1X buffer reacción, 10 U SAP en un volumen final de 20 μ L, la reacción se incubo por 30 min a 37°C, seguido de un calentamiento a 65°C por 15 min, para la inactivación de la enzima. Para la ligación inserto-vector se utilizo una relación de 5:1, por lo que la mezcla quedo, 7.7 pmol vector (pET28a), 38.5 pmol inserto (WSSV ADN polimerasa), 1X buffer ligación, 4U T4 DNA ligasa, en un volumen total de 10 μ L, la reacción se incubó a 14°C toda la noche. El constructo se transformo primeramente en bacterias *E. coli* DH5 α y se transformó nuevamente en bacterias *E.coli* BL21(DE3) tipo Rosetta II.

Para mejorar la eficiencia de expresión de la secuencia nucleotídica viral de la WSSV ADN pol, se utilizó también un constructo sintético. Por lo que el gen sintético inicio con una metionina, seguido de una etiqueta de poli-histidinas y por el fragmento del ORF514 (desde la M674 a la V1841), la cual contiene los dominios polimerasa y exonucleasa. La secuencia nucleotídica fue optimizada para el uso de codones en *E. coli*,

con la finalidad de incrementar el rendimiento durante la sobreexpresión recombinante. Este gen fue clonado dentro del vector pJExpress401 de DNA 2.0 (Menlo Park, CA, EEUU).

VII.3 Sobreexpresión heteróloga de la WSSV ADN pol.

La sobreexpresión se realizó en bacterias *E. coli* BL21 Rosetta II transformadas con la construcción WSSV-ADNpol-pJExpress. Las bacterias transformadas se sembraron primeramente en un pre-inoculo (25 mL medio LB) el cual se creció a 37°C toda la noche, con agitación constante (250 rpm), adicionado con kanamicina 25 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL. Este se añadió a 1 L de medio de cultivo TB (Terrific broth: 1.2 % de triptona, 2.4 % de extracto de levadura, 0.4 % glicerol, 0.1 M de fosfatos de potasio pH 7.0), adicionado con los mismos antibióticos y se creció a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.6 a 600 nm, se recomienda esta densidad óptica para realizar la inducción de la proteína, la cual se realizó añadiendo IPTG 0.1 mM (isopropil-β-D-tiogalactósido). El cultivo se dejó 4 h con el inductor con agitación constante (Foster *et al.*, 2003). La biomasa bacteriana se recuperó por centrifugación a 5000 x g, durante 15 min a 4 °C en un rotor Sorvall SLA-3000, de este punto en adelante todo se manejo a 4°C. Al precipitado bacteriano se le realizó una serie de lavados con una solución de cloruro de sodio 0.9% (de-la-Re-Vega *et al.*, 2006). La sobreexpresión de la proteína se monitoreo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE) en tinción con plata (Merril *et al.*, 1981).

VII.4 Purificación de la WSSV ADN Pol Recombinante.

El precipitado bacteriano de la sobreexpresión heteróloga se resuspendió en buffer lisis (25 mM glicina, 1 mM PMSF, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, pH 9.0) en relación de 8 mL por gramo de precipitado bacteriano en un baño de hielo. El resuspendido bacteriano se liso utilizando un sonicador Branson. El extracto se clarificó por centrifugación a 22,000 x g, por 20 min. La proteína se encontró en la fracción soluble y se clarificó agregando estreptomycin al 5% en relación de 15 mL por cada 100 mL de

extracto. Dicha suspensión se dejó incubando 15 min a 4°C, con agitación suave, la proteína se recuperó por centrifugación a 22,000 x g, por 20 minutos. La proteína recombinante se concentró por fraccionamiento con sulfato de amonio al 40% de saturación, el sulfato de amonio se agregó lentamente con agitación suave a 4°C, la proteína se recuperó por centrifugación. El precipitado obtenido de la centrifugación se disolvió y dializó extensivamente contra buffer C (25 mM glicina, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 9.0). Ya que la purificación de la proteína recombinante utilizando IMAC, no fue posible, debido a que no se obtuvo una proteína pura, se optó por una metodología tradicional de purificación. Primero se realizó una cromatografía de intercambio aniónico, utilizándose una columna de DEAE FF HiTrap. La elución de la proteína se realizó utilizando un gradiente lineal de NaCl 1M en buffer C. La proteína eluida se dializó contra buffer C, realizándole 4 recambios. La proteína se cargó a una segunda cromatografía de intercambio catiónico, donde se utilizó una matriz de fosfocelulosa, la peculiaridad de esta matriz es que intercambia cargas con proteínas que se unen al ADN. La elución de la proteína recombinante se realizó utilizando NaCl 100 mM en buffer C. Posteriormente la proteína se cargó en una columna de BioGel P-150 de 10 x 300 mm, en buffer C más 200 mM NaCl. Las fracciones que contenían la proteína recombinante se concentraron utilizando un Centricon PL-30. La purificación se monitoreó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE) al 8% en tinción con plata (Merril *et al.*, 1981).

VII.5 Determinación de la actividad enzimática de la WSSV ADN pol.

La determinación de la actividad de una polimerasa involucra el uso de nucleótidos marcados radioactivamente (Briebe *et al.*, 2004). Para este trabajo se utilizaron dos metodologías no radioactivas implementadas y modificadas en este trabajo.

La primera técnica está basada en la apertura de una horquilla formada por un oligonucleótido (sonda molecular) que contiene un fluoróforo en un extremo y un grupo

opacante de la fluorescencia en otro. El oligonucleótido adopta una estructura de horquilla (quedando juntos el fluoróforo y el opacante), y al polimerizar una secuencia dentro del lazo se separa el tallo de la horquilla y se emite la fluorescencia al quedar libre el fluoróforo. La emisión de fluorescencia se detecta en un termociclador con detección fluorométrica para PCR de tiempo real (RT-PCR) (Ma *et al.*, 2007). Este método de detección de actividad polimerasa se utilizó para dar seguimiento a los diferentes pasos de purificación.

Un ensayo más fino y específico para evaluar la incorporación de nucleótidos por efecto de la WSSV DNA pol es utilizando metodologías que no requieren radioactividad. Para este fin se utilizó un oligonucleótido marcado con digoxigenina (DIG) en su extremo 5'. Este iniciador tiene un tamaño definido, sobre del cual se da la extensión, y se evalúa el incremento de tamaño del iniciador mediante separación electroforética y detección inmunológica del DIG. Los conjugados de iniciador con la sonda molecular se prepararon en un amortiguador, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl₂ y 1 mM DTT, se utilizó como control del ensayo el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli*. Todas las muestras se incubaron a 37°C y la fluorescencia se detectó en un termociclador de tiempo real (Ma *et al.*, 2007).

El ensayo no radioactivo de incorporación de nucleótidos para demostrar la actividad de polimerasa de la proteína recombinante codificada por el ORF514 se realizó de la siguiente manera. Se diseñó un oligonucleótido de 24 pares de bases (oligo A; Tabla 2) marcado con DIG en su extremo 5', el cual se hibridó con un oligonucleótido de 48 pares de bases (oligo B; Tabla 2). Para la hibridación del oligo A con el oligo B se mezcló, 2.2 µL oligo A y 3.2 µL oligo B (partiendo de soluciones madre de 3 nM), en un volumen final de 100 µL. La reacción se incubó por 5 min a 95°C y se dejó enfriar lentamente. En la reacción de actividad se mezclaron 2.8 pM del híbrido, 25 µM de cada dNTP, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5. La reacción se incubó a 37°C por 16 min y terminada por la adición de buffer de formamida (95 % formamida, 25 mM EDTA, 0.1% xilen cianol, 0.01% azul de bromofenol). Los productos de ADN fueron separados en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 18%, con 8M urea (Briebe *et al.*, 2004).

Para la detección del ADN, este fue transferido a una membrana Hybond utilizando un aparato de transferencia semi-seco (BioRad, Hercules, CA, EEUU) a 25 volts por 30 min, utilizando buffer TBE 0.5x para humedecer la membrana. El ADN se entrecruzo (fijación) a la membrana utilizando luz UV aplicando una energía de 12,000 μ J por 30 seg. Para proseguir con 2 lavados de 5 min con buffer de lavado (0.1 M ácido maléico, 0.15 M NaCl, 0.3% Tween 20, pH 7.5), seguido del bloqueo de la membrana utilizando solución de bloqueo (Roche) por 30 min. Posteriormente se incubó la membrana por una hora con anticuerpo anti-DIG marcado con fosfatasa alcalina, diluido 1:20,000 en solución de bloqueo. Seguido de 2 lavados por 15 minutos con buffer de lavado. La detección de color se realizó utilizando el reactivo NBT/BCIP (Nitro azul de tetrazolio cloruro/5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato).

Tabla 2.- Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de actividad de polimerasa.

Nombre	Secuencia (5'-3')
Oligo A	DIG-CGCAGCCCACCTGCCACCTAACT
Oligo B	CCTTGGCACTAGCGCAGGGCAAGTTAGGTGGGCAGGTGGGCTGCG

VII.6 Modelación Molecular de la WSSV ADN pol Codificada por el ORF514

La modelación molecular se ha convertido en una herramienta útil en la comprobación de hipótesis sobre la unión de ligandos. Un ejemplo de esto es el diseño de fármacos dirigidos a proteínas de una gran variedad de organismos patógenos, no solo para el ser humano si no para todo los organismos vivos. La predicción de la estructura tridimensional requiere de cuatro pasos generales: 1) identificación de una proteína homóloga con estructura conocida experimentalmente; 2) alineamiento entre la secuencia que se modelará y la secuencia de la proteína molde; 3) construcción del modelo basado en el alineamiento; y 4) evaluación del modelo (Xiang 2006).

Con el conocimiento de la secuencia de aminoácidos de la WSSV ADN pol y su homología con la polimerasa del virus del Herpes simple tipo 1 (HSV1), se modeló el

dominio polimerasa y exonucleasa de la WSSV ADN pol superponiendo dichos dominios en la estructura cristalográfica de la polimerasa tipo B del HSV1 depositada en el banco de proteínas (PDB:2GV9) (Liu *et al.*, 2006). Para esto se utilizó el programa *Molecular Operating Environment* (MOE, por sus siglas en inglés) en su versión 2009.10 (Chemical Computing Group), donde se construyeron 25 modelos intermedios bajo el campo de fuerza CHARMM27 a partir del alineamiento de secuencias. Las coordenadas del ADN en complejo con la estructura de la WSSV ADN pol se tomaron del complejo de replicación cristalográfico de la ADN polimerasa del fago RB69 (PDB:1IG9) (Franklin *et al.*, 2001). La asignación de regiones y colores de cada uno de los dominios de la estructura de la WSSV ADN pol se realizaron utilizando el programa PyMOL 1.0 (DeLano 2002).

VII.7 Caracterización LvPCNA

VII.7.1. Secuenciación y Caracterización del ADNc del PCNA. Para la obtención del ADNc que se utilizó en la amplificación del gen del PCNA, se partió de ARN donado por la Dra. Gloria Yepiz Plascencia (CIAD, Hermosillo). Se utilizó un sistema de transcripción reversa (QIAGEN, Valencia CA, EEUU), sintetizándose 1 µg de ARN total, bajo las condiciones que recomienda el fabricante, usando ARN total de branquias del camarón como templado para la síntesis del ADNc.

Para los ensayos de tiempo real, en donde se midió la expresión de los genes de PCNA y WSSV ADN pol se utilizaron 15 camarones infectados, de los cuales se disectaron los diferentes tejidos utilizados en el análisis. La extracción de ARN total se realizó por la metodología de TRiZOL (Invitrogen Carlsbad, CA).

VII.7.2. Obtención y Amplificación del ADNc de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Para la obtención del transcrito completo del PCNA, se diseñaron iniciadores en base a las secuencias de nucleótidos del camarón japonés (*Marsupenaeus japonicus*) y camarón chino (*Fenneropenaeus chinensis*), con número de acceso en el banco de genes **ACA09718.1** (Zhang *et al.*, 2010) y **ABM66815.1** (Xie *et al.*, 2008), respectivamente. También se conto con una secuencia parcial hacia el extremo 3' de camarón blanco

donada por la Dra. Gloria Yepiz Plascencia. Se realizó un alineamiento de las tres secuencias y se diseñaron juegos de iniciadores que flanquearan la secuencia del PCNA de camarón blanco que se tenía hasta el momento PCNAfw y PCNArv (Tabla 3).

Para lograr amplificar los extremos 5' y 3' del PCNA y con base en las especificaciones del sistema DNA walking de *Seegene* se diseñaron iniciadores que cumplieran con los requerimientos establecidos por el fabricante, los cuales fueron PCNAfw 1, 2 y 3, así como los iniciadores PCNArv 1, 2 y 3 (Tabla 3). Las condiciones de amplificación de los extremos 5'UTR y 3'UTR fueron de acuerdo a lo establecido en el protocolo de *Seegene*. Dado que son 3 reacciones, los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 %, los cuales fueron visualizados utilizando el colorante SYBRgreen y un transiluminador UV.

La amplificación por PCR del transcrito del PCNA se llevó a cabo utilizando el ADNc previamente sintetizado. La reacción se preparó mezclando 1 µL de ADNc, 1 U de *pfu* polimerasa, 10 pmol de cada iniciador específico, 50 µM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂ en amortiguador 20 µM Tris-HCl, 50 µM KCl, pH 8.3. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes, 1 ciclo de 75°C, 10 min; 1 ciclo de 95°C por 5 min; 38 ciclos de 94°C, 1 min, 52°C, 1 min, 72°C, 1.5 min; 1 ciclo de 72°C, 10 min. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, los cuales fueron visualizados utilizando el colorante SYBR green y un transiluminador de luz ultravioleta.

VII.7.3. Modelación Molecular del *Lv*PCNA. La modelación del *Lv*PCNA se realizó por la superposición de la secuencia deducida de aminoácidos del *Lv*PCNA en la estructura cristalográfica del PCNA humano (Gulbis *et al.*, 1996) (PDB:1AXC) utilizando el programa MOE 2010.10 (ChemComp, Montreal, Canada). Se construyeron 50 modelos iniciales bajo el campo de fuerza CHARMM27 a partir de un alineamiento múltiple de estructura y secuencia de aminoácidos (PDB 1VYJ, 2ZVV, 3GPN, 2IO4, 1RWZ, 2IJX, 1UD9, 1GE8, 3IFV and 3K4X). Las coordenadas del ADN en complejo con el PCNA se establecieron utilizando como templado el PCNA de *E. coli* (PDB:3BEP) y la de *Saccharomyces cerevisiae* PCNA (PDB: 3K4X) (Georgescu *et al.*,

2008; McNally *et al.*, 2010). La asignación de los dominios y las figuras se realizaron con el programa PyMOL 1.0 (DeLano 2002).

Tabla 3.- Iniciadores utilizados para la obtención y amplificación del gen del PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*).

Nombre	Secuencia (5'-3')
PCNAfw	ATGTTCGAAGCCCGTCTCGTG
PCNArv	TTATGAGTCTTCGTCCTCAGT
PCNAfw1	TTCGACAAGTACCGCTGC
PCNAfw2	GGGAGTTCGCACGTATCTGCA
PCNA2fw3	GTTGAGGGACACGAGCGACA
PCNA2rv1	TGTCGCTCGTGTCCTCAA
PCNArv2	TGCAGATACGTGCGAACTCCC
PCNArv3	ACATGCTGGTGAGATTCATGCC

VII.8 Expresión del LvPCNA y WSSV ADNpol en tejido de camarón por qRT-PCR.

El ADNc antes sintetizado se utilizó para evaluar la expresión relativa de LvPCNA, en diferentes tejidos de camarón blanco sano, hepatopáncreas, hemocitos, branquias, músculo. Se diseñaron iniciadores específicos para la expresión de LvPCNA y WSSV ADN pol y se utilizó el gen de la proteína ribosomal L8 para normalizar los datos (Tabla 4). Para el ensayo en el cual se detectó la expresión de LvPCNA y WSSV ADNpol se utilizaron 15 camarones infectados con WSSV para el estudio ($n=15$) y el análisis se realizó por triplicado. Las muestras de tejidos de camarón sano y camarones infectados con WSSV se donaron por la Dra. Adriana Muhlia Almazán.

Todas las reacciones de qRT-PCR se realizaron en un aparato iQ5 multicolor (Bio Rad, Hercules, CA), las reacciones se realizaron como sigue: 12.5 μ L de 2X iQ Sybr

green supermix (Bio Rad, Hercules, CA), 0.7 μ L (5 μ M) de cada iniciador, 150 ng ADNc de cada organismo, en un volumen total de 25 μ L. Las condiciones para ambos genes fueron: 95°C, 5 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 s, 51°C por 35 s, 72°C por 55 s, con una curva final de disociación de 60°C a 95°C incrementando 0.3°C cada 20 s. Las lecturas de fluorescencia fueron tomadas a los 72°C después de cada ciclo de amplificación. Para L8 las condiciones fueron las mismas solo con un cambio en la temperatura de alineamiento de 60°C. Los cálculos de los niveles de expresión en los diferentes tejidos para el gen de *LvPCNA* se realizaron usando la formula de $2^{-\Delta CT}$ (Schmittgen y Livak 2008). Para analizar los datos de expresión durante los diferentes tiempos post infección la formula es $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen 2001). Los cálculos se basaron en el valor de C_T , durante la amplificación de PCR, la sustitución de la formula quedo $2^{-((C_{Ttarget}-C_{TL8})-(C_{Tavgtarget}-C_{TavgL8}))}$. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía, y análisis de post hoc se realizaron por la prueba de Tukey. Los datos fueron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$, los análisis se realizaron utilizando el programa NCSS.

Tabla 4.- Iniciadores utilizados para la expresión de los genes del *LvPCNA* (*Proliferating cell nuclear antigen*) y WSSV ADN polimerasa.

Nombre	Secuencia (5'-3')
PCNAfw1	TTCGACAAGTACCGCGTGC
PCNArv1	TGCAGATACGTGCGAACTCCC
WSVrtfw1	AGATTGAGCACCCCTCAAGA
WSVrtrv1	TCTGGAACCATCCTGCTGAT
PCNAFw3L8	TAGGCAATGTCATCCCCATT
PCNArv3L8	TCCTGAAGGAAGCTTTACACG

VII.9 Análisis y Secuenciación de WSSV ADN pol y LvPCNA

El ADN plasmídico recombinante aislado y purificado de la WSSV ADN pol y del PCNA se secuenciaron utilizando los servicios del *Genomic Analysis and Technology Core* de la Universidad de Arizona, así como los fragmentos de PCR del PCNA. La secuencia deducida de aminoácidos obtenida a partir de la secuencia de nucleótidos se comparó contra las secuencias depositadas en bases de datos como el GenBank, utilizando el algoritmo BLASTx disponible en Internet (Altschul *et al.*, 1990). También se utilizó el programa Clustal W y Box Shade (Thompson *et al.*, 1997).

VIII. RESULTADOS y DISCUSIÓN

VIII.1 Caracterización de la WSSV ADN Polimerasa

Para dar inicio con los estudios de caracterización del ORF514, primeramente se obtuvo un fragmento de aproximadamente 3.4 kilo pares de bases (kb), como se puede ver en la figura 10 panel A. Para comprobar que se trataba del gen de interés, la secuencia de nucleótidos fue analizada *in silico* para conocer su patrón de restricción, donde se identificaron las enzimas de restricción que cortaban al fragmento, y conocer el tamaño de los productos de dicha digestión. Para este análisis se utilizó un sitio web de libre acceso en la página <http://arbl.cvmb.colostate.edu/molkit>. En la figura 10 panel B, se pueden observar los patrones de bandeado esperados los cuales son de 701, 749, 2250, para la enzima *EcoRI*. Para la enzima *PvuII* los patrones son 279, 1580, 1741; por último para la enzima *NdeI* los patrones son de 82 y 2738 pares de bases.

Posteriormente esta región del ORF514 correspondiente al gen de la WSSV ADN pol, se clonó dentro del vector de expresión pET28b (Novagen). La construcción fue transformada en bacterias *E. coli* DH5 α y retransformado en las bacterias *E. coli* BL21(DE3)Rosetta (Novagen). Las colonias positivas se identificaron por PCR de colonia, donde se utilizaron iniciadores específicos de una región interna localizada en el dominio polimerasa del gen de la WSSV ADN pol. Como se puede observar en la figura 10 panel C, se obtuvieron dos colonias transformadas con el constructo.

La sobreexpresión de la WSSV ADN pol dio lugar a cuerpos de inclusión, por tal motivo se buscó la optimización de las condiciones de expresión de la proteína recombinante. Dichas condiciones fueron 16°C en caldo TB manteniendo el pH del medio de cultivo a 7.0 con buffer fosfatos, condiciones reportadas para la polimerasa del fago T7 (Schlicke y Brakmann 2005). La WSSV ADN polimerasa se obtuvo en la

fracción soluble pero en bajas concentraciones. Con el fin de incrementar el rendimiento se utilizó un gen sintético a partir de la secuencia de aminoácidos de la WSSV ADN polimerasa (DNA 2.0), con codones optimizados para sobreexpresar en *E. coli*.

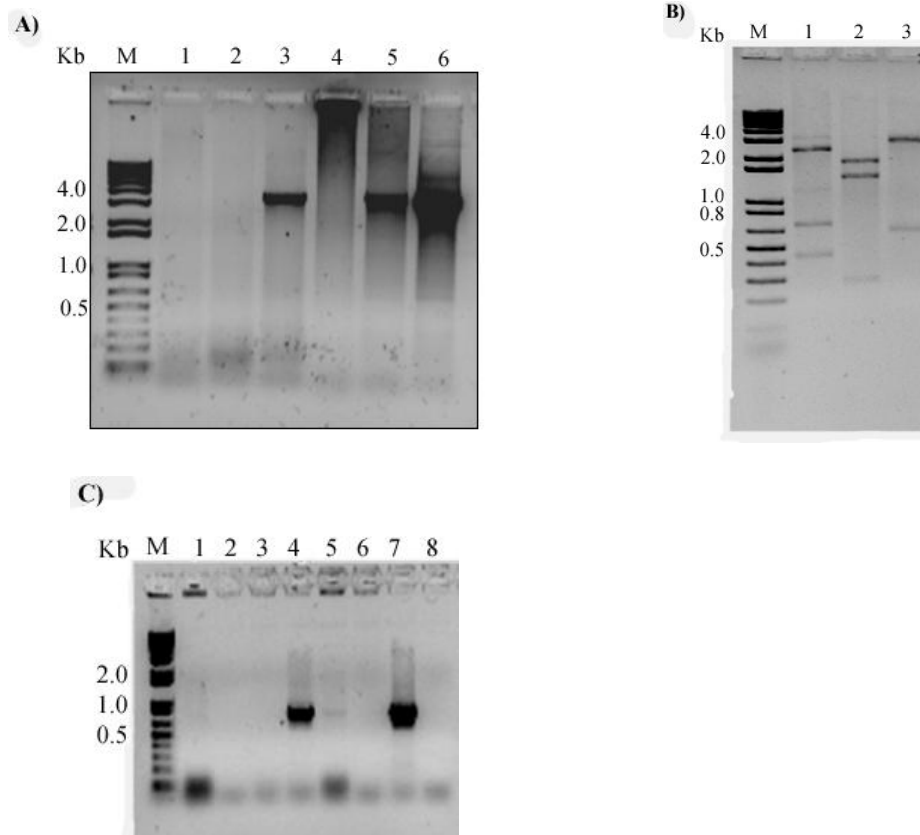


Figura 10.- Amplificación de una región interna del ORF514 que contiene el dominio polimerasa. Panel a) Diferentes muestras de ADN genómico para la obtención del gen de la WSSV ADN polimerasa. Panel b) Mapa de restricción de la ADN polimerasa del WSSV. Carril 1, digestión con *EcoRI*; carril 2 con *PvuII*; carril 3, con *NdeI*. Panel c) PCR de colonia, carril 1-6 colonias bacterianas, carril 7 control positivo, carril 8 control negativo. M, marcador de peso molecular 1 kb plus.

Existen cepas comerciales de *E. coli* que contienen artificialmente en su genoma copias de los codones raros para bacterias, con el fin de optimizar la producción de proteínas heterólogas. De forma alternativa, se pueden modificar los codones raros a codones comunes para la bacteria mediante mutagénesis dirigida, o sintetizar

completamente la región codificante mediante oligonucleótidos de ADN sobrepuestos y ligados entre sí. A esto es lo que se le conoce como un gen sintético (Itakura *et al.*, 1977).

El vector que se utilizó para la clonación del gen sintético de la ADN polimerasa del WSSV fue el pJexpress401, a dicho constructo se le incluyeron en el extremo amino terminal una etiqueta de seis histidinas, con la finalidad de purificar la proteína utilizando IMAC. El constructo sintético se transformo en bacterias *E.coli* del tipo Rosetta para la sobreexpresión. Como se puede ver en la figura 11 se observa una banda de aproximadamente 140 kDa, la cual concuerda con el tamaño esperado de la proteína.

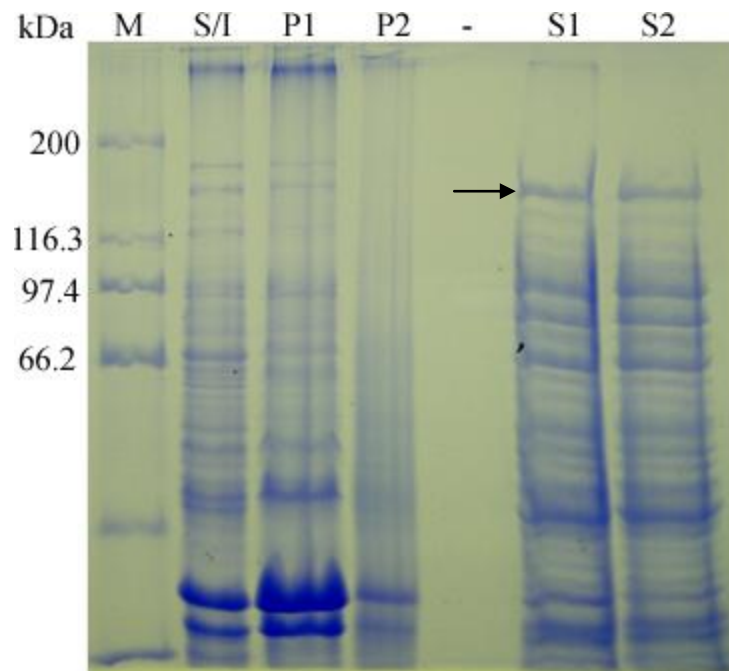


Figura 11.- Sobreexpresión recombinante de la WSSV ADN polimerasa. M: marcador de peso molecular amplio rango, S/I: muestra sin inducir, P1: Precipitado lisis bacteriana tiempo 3 horas, P2: Precipitado lisis bacteriana tiempo 10 horas, S1: Sobrenadante lisis bacteriana tiempo 3 horas, S2: Sobrenadante lisis bacteriana tiempo 10 horas.

La purificación de la proteína se llevo a cabo primero por precipitación con sulfato de amonio al 40%, seguido de una cromatografía de intercambio iónico, donde la proteína se liberó con un 22.5% de NaCl, ya que la cromatografía de afinidad a metales

(IMAC) no presentó buena eficiencia para purificar la proteína. De acuerdo a la literatura, se utilizó una matriz de fosfocelulosa, la peculiaridad de esta matriz es que une proteínas que se unen al ADN, específicamente a proteínas que se unen a grupos fosfato. La proteína se eluyó con una concentración de 100 mM de NaCl, el producto de esta segunda purificación se utilizó para un tercer paso, dando como resultado una proteína 95% pura como se puede observar en el carril 2 de la figura 12.

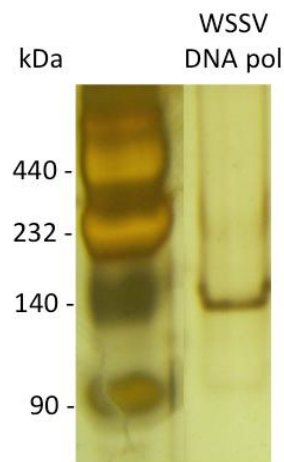


Figura 12.- Purificación de la ADN polimerasa viral. Gel de poliacrilamida nativo teñido con nitrato de plata.

Para el seguimiento de la ADN polimerasa durante cada paso de purificación se utilizó la metodología de la sonda molecular. Utilizando esta metodología se realizó un ensayo de actividad de polimerasa a diferentes temperaturas como se puede ver en la figura 13, se observó que esta enzima tiene una T_m de 27°C. Esta temperatura óptima se puede comparar con lo reportado por Jiravanichpaisal *et al.*, (2004) y Granja *et al.*, (2006), donde reportaron que el WSSV presenta una infección más agresiva a una temperatura de 22°C, esto podría suponer que la ADN polimerasa está relacionada con la infectividad del virus en el camarón (Jiravanichpaisal *et al.*, 2004; Granja *et al.*, 2006).

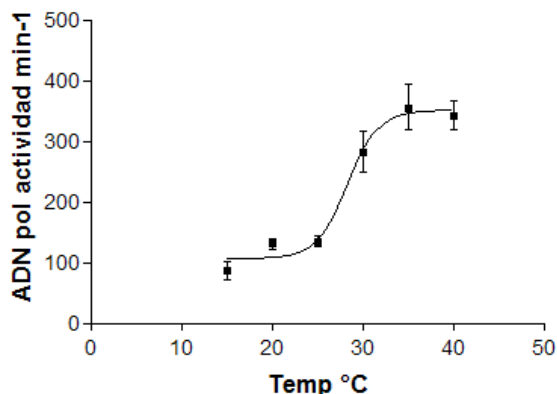


Figura 13.- Efecto de la temperatura en la actividad de la WSSV ADN polimerasa.

Una vez que se contó con la polimerasa pura, se realizó un ensayo de incorporación de nucleótidos, de acuerdo a lo que se reporta en la literatura. Como se puede ver en la figura 14, el método se basa en la incorporación de un nucleótido a un oligonucleótido marcado, y conforme ocurre la acción de la polimerasa se espera ver bandas de tamaños mayores correspondientes al tamaño del templado original. En nuestro caso, el oligo A fue marcado con digoxigenina y detectado con métodos no radiactivos por no contar con acceso a radioactivos.

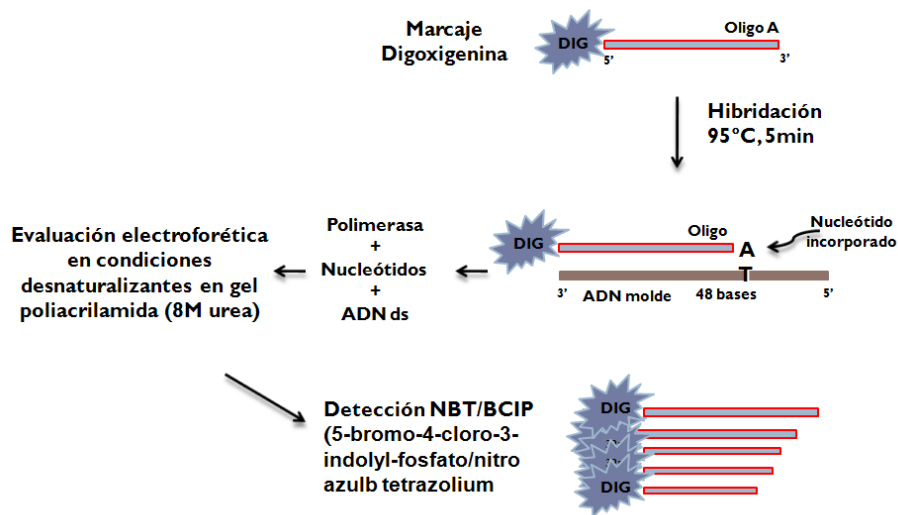


Figura 14.- Diagrama general de actividad de polimerasa. Desde su hibridación hasta su detección.

Al evaluar la polimerasa del WSSV, se pudo observar (Figura 15), que aunque hubo incorporación de los 24 nucleótidos restantes, en un tiempo de 16 minutos, esta fue poco procesiva considerando la intensidad del segundo carril respecto al tercero, que corresponde a la polimerasa del fragmento Klenow. Esto indica que el ORF514 codifica realmente una ADN polimerasa, pero que es de baja procesividad. Esta baja incorporación de nucleótidos observada *in vitro* sugiere que la WSSV ADN polimerasa pudiera necesitar proteínas accesorias tales como factores de procesividad de la replicación del hospedero.

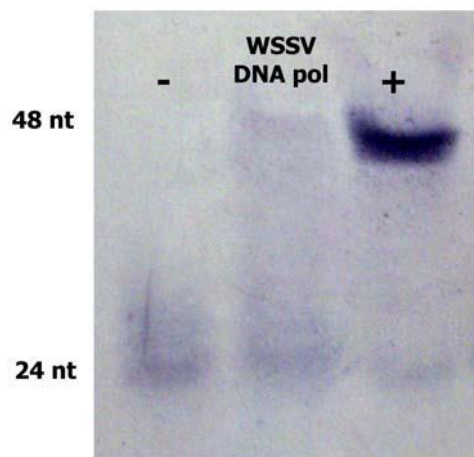


Figura 15.- Actividad polimerasa de la proteína recombinante WSSV ADN pol. Carril “-“: Control negativo reacción sin enzima. Carril WSSV DNA pol: Proteína recombinante. Carril “+“: Control positivo fragmento Klenow.

Las proteínas que confieren procesividad a las ADN polimerasas son conocidas como factores de procesividad o “*sliding clamp*”. Estos factores promueven que las polimerasas estén asociadas por más tiempo a la cadena de ADN y poder incorporar un mayor número de nucleótidos (Chaudhuri y Parris 2002). El virus del herpes tiene su unidad de procesividad conocida como UL42 la cual incrementa la procesividad y elongación de la polimerasa, también la ADN polimerasa de la bacteria *Archaeoglobus fulgidus*, la cual necesita de la pinza RFC y la unidad de procesividad PCNA (por sus siglas en inglés *Proliferation cell nuclear antigen*) los cuales también le confieren una

mayor procesividad a la polimerasa de esta bacteria (Digard *et al.*, 1993; Weisshart *et al.*, 1999; Seybert *et al.*, 2002).

A partir de la secuencia de aminoácidos se realizó la modelación molecular de la región de la WSSV ADN polimerasa sobreexpresada. Como se puede ver en la figura 16, se localizaron los dominios polimerasa (*pol*) y exonucleasa (*exo*), así como los sub dominios en el dominio polimerasa, dedos (*fingers*), pulgar (*thumb*) y palma (*palm*), el sub dominio “*fingers*” interacciona con el nucleótido trifosforado y el templado, “*thumb*” interacciona con el posicionamiento de la polimerasa con el ADN, procesividad y translocación, “*palm*” involucrado con la formación del enlace fosfodiéster (Joyce y Steitz 1995; Steitz 1999).

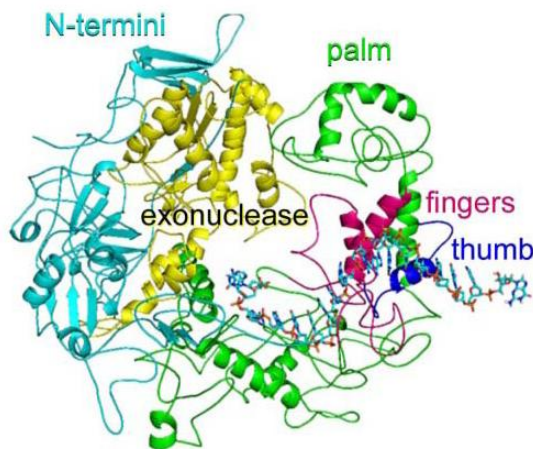
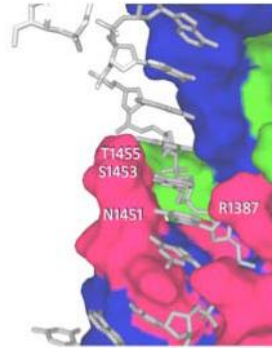


Figura 16.- Modelo molecular de la WSSV ADN polimerasa. Los subdominios se colorearon como sigue: “*fingers*” en magenta, “*thumb*” en azul, “*palm*” en verde. Los dominios se colorearon como sigue: exonucleasa en amarillo, N-termini en cian.

Así mismo se encontraron importantes interacciones de aminoácidos con el ADN, y se identificaron los residuos invariantes R1387, S1453 y T1455 los cuales se conservan desde humanos hasta levaduras (Figura 17).



WSSV	1383 YRADR	1450 SNMSA--TGGIG
Zebrafish	667 LLSAR	719 EI-SQSVTGFGFR
Human	689 LLSAR	741 EI-SQSVTGFGFR
Chlamydomonas	650 LLAAR	702 AI-SASTTSVGR
Yeast	604 LISAR	656 AI-SSSVTAYGR
Herpes Simplex	739 WLAMR	790 HV-AATVTTIGR

Figura 17.- Aminoácidos invariantes, involucrados en la interacción con el ADN. Secuencias utilizadas para la comparación: WSSV: AAK77696ORF27; Zebrafish: *Danio rerio* AAI63875; Human ABB29977; *Chlamydomonas reinhardtii* XP_001689909. Protein Data Base: Yeast: *Saccharomyces cerevisiae* PDB3IAY; Herpes Simplex Virus Type 1: 2GV9.

Siguiendo con el análisis de la estructura de la ADN polimerasa del WSSV, se logró identificar el sitio de unión de la polimerasa con el factor de procesividad PCNA. Llamado caja PIP (PCNA interacting protein por sus siglas en inglés) (Warbrick 1998), se realizó un modelo en el cual se explica y se marca la caja PIP y como podría aumentar la procesividad de la ADN polimerasa (Figura 18).

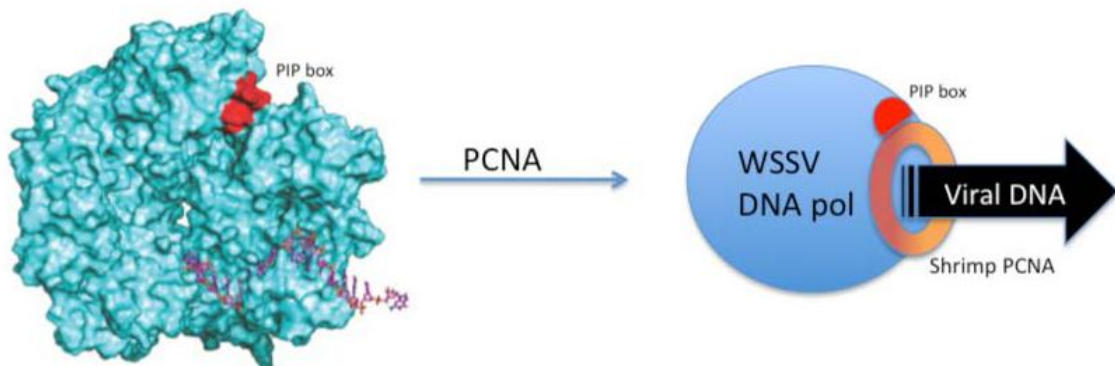


Figura 18.- Modelo propuesto de la unión del ADN a la polimerasa. En rojo se marca la caja PIP. A la izquierda la propuesta de la unión ADN polimerasa/PCNA.

Debido a que muchas polimerasas requieren de factores de procesividad y siguiendo con el análisis de la secuencia de la polimerasa del virus de la mancha blanca, se logró identificar el dominio responsable de la unión de la polimerasa con el PCNA el cual es QxxHxxA, donde la “x” es cualquier aminoácido, “H” representa un residuo hidrofóbico y “A” representa un residuo aromático (Warbrick 1998; Tori *et al.*, 2007). En la secuencia de la WSSV ADN por la caja PIP se encuentra en los aminoácidos ⁶⁸⁰QHKILYY⁶⁸⁶, pero dentro del genoma completo del virus de la mancha blanca no se ha identificado una secuencia que pueda codificar para un factor de procesividad, por tal motivo se hipotétiza que la polimerasa del virus utiliza la pinza PCNA del huésped en este caso del camarón blanco. Esto es parecido a lo que sucede con la polimerasa del fago T7 en donde el fago utiliza la tioredoxina de la bacteria *E.coli* como factor de procesividad (Huber *et al.*, 1987).

VIII. 2 Caracterización del PCNA de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

El PCNA (por sus siglas en inglés *Proliferating cell nuclear antigen*) o también conocido como “*sliding clamp*”, es una de las proteínas involucradas en la replicación del ADN o “replisoma” (Johnson y O'Donnell 2005b). Esta también puede ser encontrada en diferentes procesos de división celular, ya que está trabaja en la fase “S”, interacciona con otras proteínas que se encuentran en la reparación del ADN tales como la p21, Gadd45, CDK2 (Fukuda *et al.*, 1995; Kelman 1997; Tsurimoto 1998; Maga y Hubscher 2003). El PCNA se ha identificado en una gran variedad de crustáceos tales como el camarón chino *Fenneropenaeus chinensis* (Xie *et al.*, 2008), el camarón japonés *Marsupenaeus japonicus* (Zhang *et al.*, 2010), el cangrejo chino *Eriocheir japonica sinensis* (Li *et al.*, 2010). Dado que el genoma completo del WSSV no cuenta con una proteína que le sirva como factor de procesividad al virus y con el conocimiento de que algunos virus utilizan la maquinaria del huésped (Caspar y Klug 1962; Berkhout y Haasnoot 2006), la caracterización del PCNA de camarón blanco se vuelve importante ya

que hasta el momento no se conocía la secuencia completa de este gen en *Litopenaeus vannamei*.

La caracterización del cDNA dio inicio con la búsqueda de secuencias que pudieran servir para el diseño de iniciadores específicos y así encontrar los extremos 5'-UTR y 3'-UTR. Hasta el momento se tenían tres secuencias un EST (por sus siglas en inglés expressed sequence tag) (Clavero-Salas *et al.*, 2007), la secuencia de *F. chinensis* y la de *M. japonicus*. Como se puede ver en la figura 19, se obtuvo una secuencia de 1103 pares de bases, depositada en la base de datos de genes (GenBank JN034913), con 111 bases del extremo 5'-UTR, 783 pares de bases para la región codificante que incluye a metionina inicial y el codón de terminación. En el extremo 3'-UTR se identificó la cola de poliadenilación (poly A+) y la señal de adenilación, estas dos regiones son necesarias para la estabilidad del ARN. La región codificante de 739 pares de bases codifica para una proteína de 260 aminoácidos, con un pI teórico de 4.59 y un peso molecular calculado de 28.8 kDa. Valores similares como los reportados para *F. chinensis*, *M. japonicus*, *E. japonica sinensis* (Xie *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

```

3 ACCTTCCGAAGCGGGCACCAGCACCAGACGTGTCAACCCCCCTACGGCGTCCAGCACCC
1                                     M F E
63 CCGCCAGTTCTAGTCTCCGTGCGCCGCCGACCCCCCACACAGCCGCCACCATGTTTCGAA
20 A R L V Q G S L L K K V L E A I K D L L
123 GCCCGTCTCGTGCAGGGGAGCCTCCTCAAGAAGGTCCTGGAGGCCATCAAGGACCTGCTG
40 N E A S W D C A D S G I Q L Q A M D N S
183 AACGAGGCGTCTGGGACTGCGCCGACTCGGGGATCCAAGTGCAGGCCATGGACAACCTG
60 H V S L V S L N L R A E G F D K Y R C D
243 CACGTGTGCTCGTGTCCCTCAACCTCCGCGCCGAGGGGTTTCGACAAGTACCGTGCAC
80 R N L I M G M N L T S M S K I L K C A A
303 AGGAACCTCATCATGGGCATGAATCTCACCAGCATGTCCAAAATCCTCAAGTGTGCAGT
100 N D D I I T M K A Q D N A D T V T F M F
363 AACGATGACATCATCACAAATGAAGGCCAGGATAACGAGACACCGTCACATTCATGTTC
120 E S P N Q E K V S D Y E M K L M N L D Q
423 GAATCGCCCAACCAGGAAAAGGTCCTCCGATTATGAAATGAAGCTGATGAACCTTGATCAG
140 E H L G I P E T D Y A C V I K L P S G E
483 GAACATCTGGCATTCCAGAAACAGATTATGCGTGTGTATCAAATGCCTTCTGGGGAG
160 F A R I C R D L S Q F G E S I V I A C T
543 TTCGCACGTATCTGCAGAGATCTTAGTCAGTTTGGAGAGAGCATTGTCATTGCCTGCACA
180 K E G V K F S A A G D I G T A N I K L A
603 AAGGAAGGAGTCAAATTCCTGCAGCAGGAGATATTGGTACTGCAAACATCAAGCTGGCA
200 Q T S S V D K E E E A V V I E M Q E P V
663 CAGACCTCCAGTGTAGACAAAGAGGAGGAGGCAGTCGTTATTGAGATGCAGGAGCCTGTC
220 T L T F A C R Y L N M F T K A T P L S P
723 ACGCTCACCTTTGCTTGCAGATACCTGAACATGTTCAAAAAGCAACACCCCTTTCCCA
240 Q V S L S M S P D V P L V V E Y A I G E
783 CAGGTTTCACTTTCTATGTCCCTGATGTACCCCTGGTTCGTTGAATATGCTATTGGTGAG
260 I G H I R Y F L A P K I E D E D S *
843 ATTGCCACATCCGTTACTTCTTGGCCCCAAGATTGAGGACGAAGACTCATAAGCTTGA
                                     Stop codon
903 AGAATAGGCCTTTTTAGGGAACAATAAAATGTACAAAAATGATTAAAAAAAATACTGCTA
                                     polA signal polIA tail
963 GATGTGAATGTGGTAAAATATAAAGTTACTTTAGCATAGCACATTTTGTAAACCGTTAT
1023 TGTAATTTTTAAAAAGCTTTTACTCATTTTATTCTACACTGTACTACTGAATCTGAATA
1083 TGCAATAGATACTTTTCCCAA

```

Figura 19.- Secuencia completa de nucleótidos y aminoácidos del *Lv*PCNA. La Met inicial esta subrayada, el codon de terminación esta marcado con un asterisco, la señal de poliadenilación esta subrayada y en negritas, mientras que la cola de poliadenilación esta subrayada y en *cursiva*. Se depositó en GenBank con la clave JN034913.

A la secuencia de camarón del PCNA se le realizó un alineamiento múltiple con otras secuencias homólogas de otras especies (Figura 20), encontrando que el *Lv*PCNA es

muy conservado entre vertebrados e invertebrados. Asimismo se identificaron los tres dominios necesarios para la interacción PCNA/ADN/Polimerasa, los cuales son el “*center loop*”, que interacciona con el factor de replicación C (RFC) y la polimerasa delta, el “*interdomain connecting loop*” que interacciona con la polimerasa delta y el “*C-terminal*” interacciona con el RFC (Tsurimoto 1998; Maga y Hubscher 2003; Vijayakumar *et al.*, 2007).

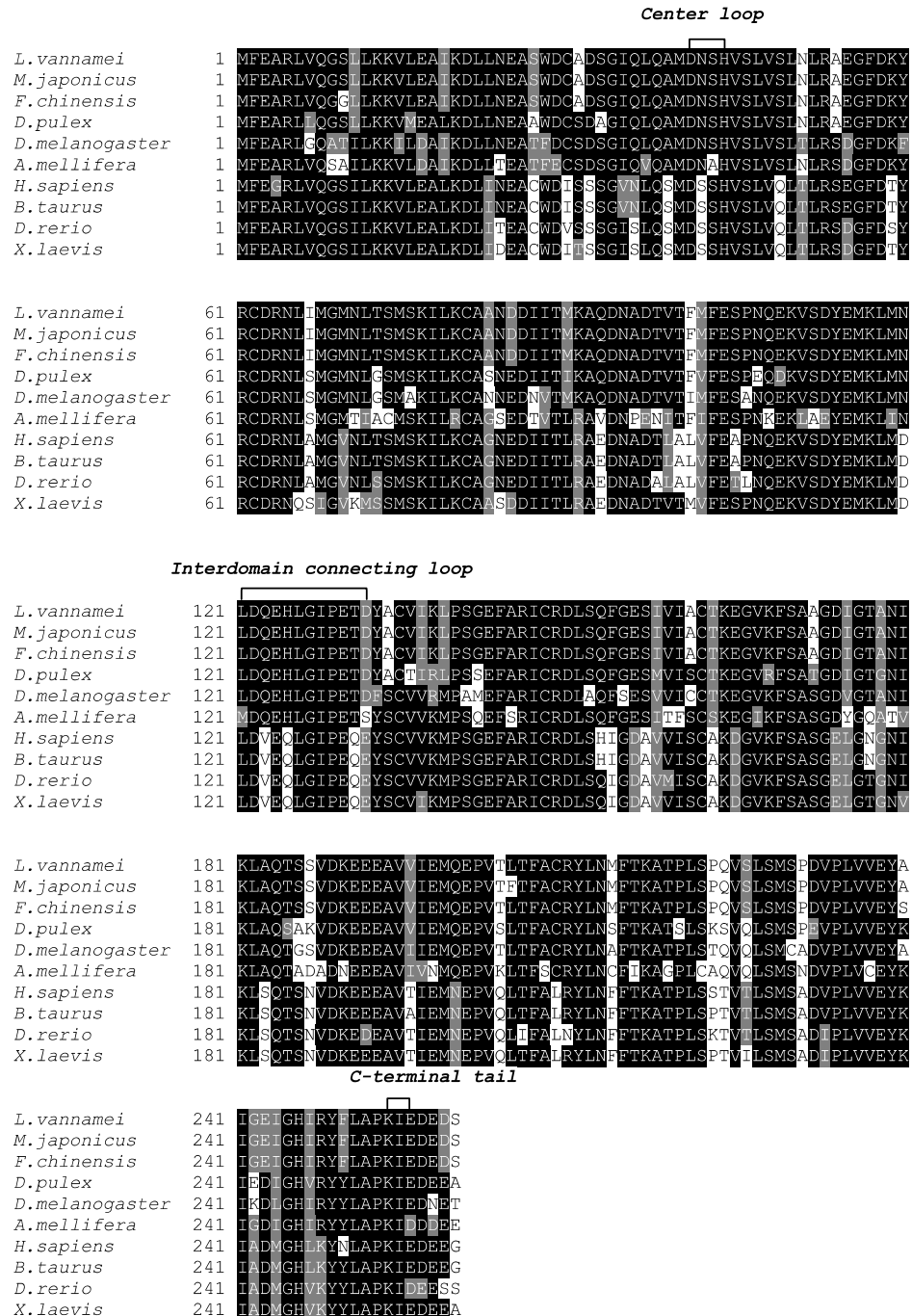


Figura 20.- Alineamiento múltiple de la secuencia deducida de aminoácidos del LvPCNA con otros PCNA. *M. japonicus* (ACA09718.1), *F. chinensis* (ABM66815.1), *D. pulex* (EFX70582.1), *D. melanogaster* (AAA28746.1), *A. mellifera* (XP_001122985.1), *H. sapiens* (CAG46598.1), *B.*

Taurus (DAA23435.1), *D. rerio* (AAH49535.1), *X. laevis* (NP_001081011.1). Los tres dominios importantes están marcados, “center loop”, “interdomain connecting loop” y “C-terminal tail”.

Con la secuencia deducida de aminoácidos se realizó la modelación de la PCNA de camarón y se encontró que desde levaduras, invertebrados y vertebrados, todos tienen el mismo plegamiento y misma estructura cuaternaria. Esto quiere decir que los PCNA forman una estructura trimérica en forma de “dona”, cada uno de los polipéptidos está formado de dos dominios funcionales (Figura 21 panel A). El PCNA es cargado a la cadena de ADN por el RFC, cuando ya está cargado en el ADN templado, la polimerasa se une a él y esto le da más procesividad a la polimerasa ya que mantiene más tiempo unida a la polimerasa a la cadena de ADN, puesto que el ADN está cargado negativamente por los fosfatos laterales de la cadena y la cavidad interior del PCNA está cargada de forma positiva (Figura 21, panel B). Como se puede ver en la figura 21 panel C, los aminoácidos Arg y Lys están de cara al interior del anillo, esto puede verse en la predicción del modelo molecular, donde se pueden dar las interacciones iónicas (Figura, panel D).

La cavidad central del modelo del *Lv*PCNA expone 9 residuos básicos de cada subunidad en la superficie que tiene contacto con el ADN durante la replicación lo que hace que no se separe del replisoma. Estos residuos incluyen la Lys13, Lys14, Lys20, Lys77 y Lys80 del dominio hacia el extremo N-terminal y los aminoácidos Arg146, Arg149, Arg210 y Lys217 del dominio hacia el extremo C-terminal. Todos estos residuos están localizados en las estructuras secundarias de las α -hélices del PCNA, apuntando hacia la superficie interna de la “dona” donde establecen interacciones electrostáticas no específicas con el ADN (Figura 21 panel C y D).

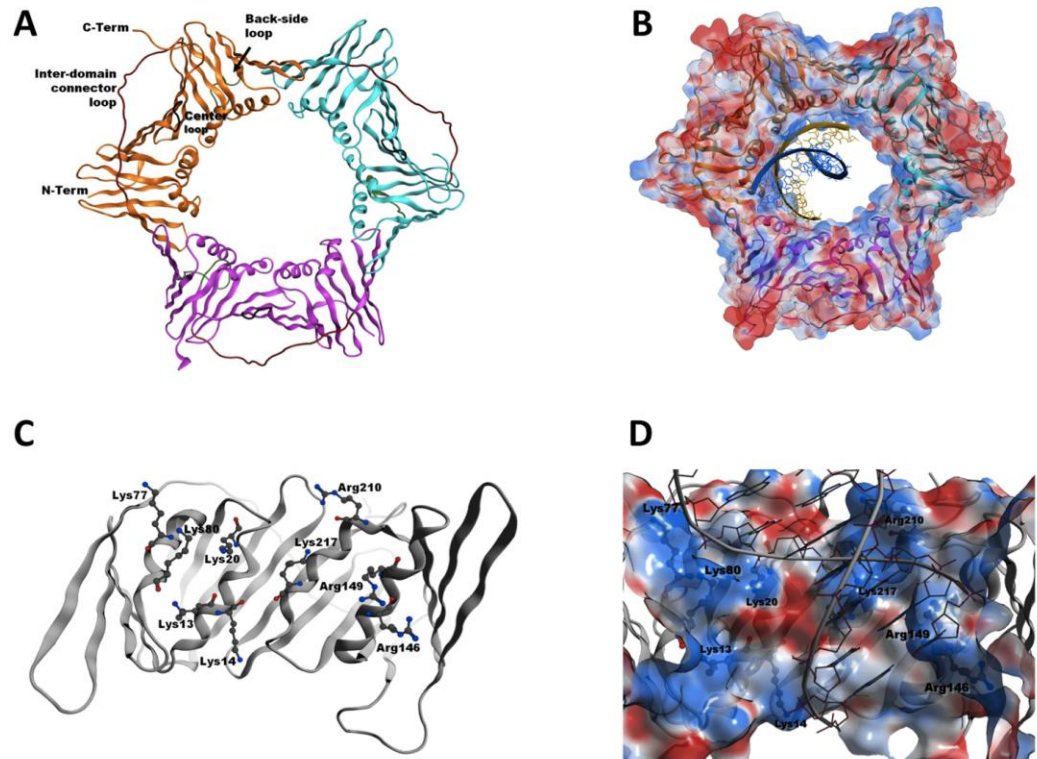


Figura 21.- Modelación molecular de *Lv*PCNA. Panel A) Plegamiento del trómero del PCNA (monómeros son coloreados en naranja, cian y magenta), los dominios funcionales están indicados. Panel B) trómero con la doble hélice del ADN, con la superficie electrostática coloreada en rojo (cargas negativas), en azul (cargas positivas). En azul están marcados los residuos Lys y Arg. Panel C) Posición de los residuos básico que se unen al ADN. Panel D) Similar a panel C unido al ADN con sus cargas electrostáticas.

También se midió la expresión del gen de PCNA en diferentes tejidos del camarón como el hepatopancreas (Hp), músculo (M), branquias (G) y hemocitos (Hm), y se encontró que *Lv*PCNA se expresa en los 4 tejidos analizados, pero la expresión de ARNm varía entre ellos como se puede ver en la figura 22. El *Lv*PCNA se expresa en músculo>hemocitos>hepatopancreas>branquias, siendo músculo el que más se expresa con aproximadamente más de 200 veces que en branquias, estos resultados de expresión en diferentes tejidos son similares a los obtenidos para camarón chino (Xie *et al.*, 2008). Estos resultados fueron útiles para saber en que tejido se realizarían los ensayos de

expresión de PCNA y WSSV ADN pol en camarones infectados, por lo que se determinó que el tejido adecuado para la detección sería músculo.

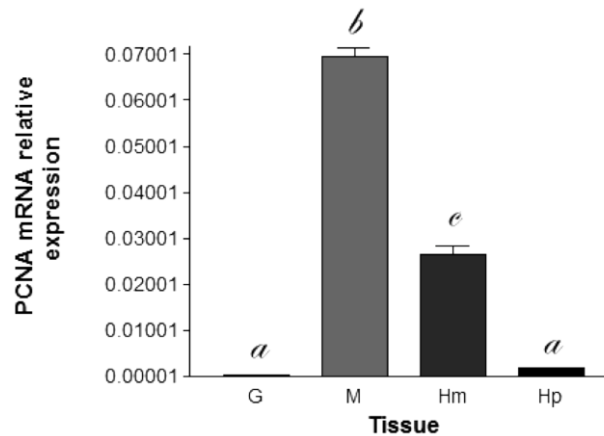


Figura 22.- Expresión relativa del ARNm de *Lv*PCNA en diferentes tejidos. Diferentes letras en *cursiva* presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tejidos. G: branquias, M: músculo, Hm: hemocitos, Hp: hepatopáncreas.

Con los datos analizados se vio que la WSSV ADN pol se expresa a las 6 horas post infección, estos resultados concuerdan con los reportados por Chen y cols., (2002), en donde encontraron que la polimerasa del WSSV se expresa a las 2 h post infección, sin embargo estos autores no midieron la expresión del gen (Chen *et al.*, 2002).

Se detectó la expresión del gen de la ADN pol del virus a las 6 h post infección, pero a las 12 h se vio que no hubo detección del transcrito, esto nos sugiere que el virus puede estar sintetizando su ADN y no hay expresión del gen. El hecho de que no se detecte el transcrito no significa que no haya polimerasa, pues la proteína puede ser estable por varias horas. También este gen de la polimerasa está clasificado en los genes tempranos del virus y dado que la infección apenas está dando inicio, nosotros sugerimos que a las 12 h el virus se este formando o expresando proteínas tardías tales como las proteínas de la cápside (van Hulten *et al.*, 2001). Así mismo como se puede ver en la figura 23 (panel A), a las 24 y 48 h se ve como aumenta la expresión exponencial del gen de la WSSV ADN pol lo que pudiera darle soporte a la aseveración que se hace con el tiempo de 12 h, que sugiere que el gen es un gen de expresión temprana.

Por su parte el gen de *LvPCNA* se expresó a todo lo largo de la infección y no se vio una diferencia significativa en la expresión ($p > 0.05$) (Figura 23, panel B), lo que podría sugerir que este se pudiera tomar como un gen constitutivo. Lo que se puede ver es una tendencia a disminuir conforme va pasando el tiempo de la infección ya que al tiempo inicial, donde no hay virus, el PCNA está expresado en cantidades mayores. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Xie y cols (2008), quienes observaron que a las 12 y 24 h post-infección hay un aumento en la regulación del gen (Xie *et al.*, 2008).

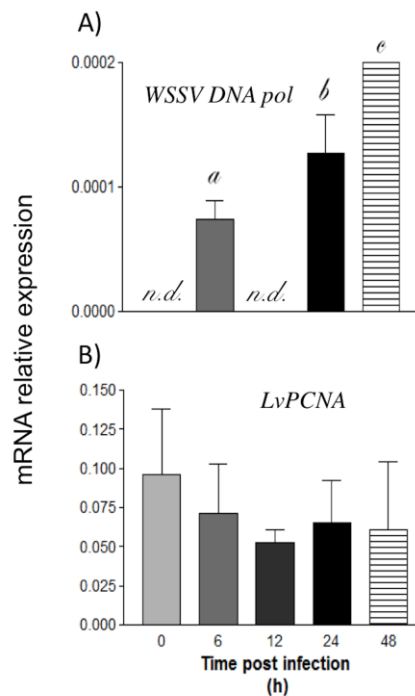


Figura 23.- Expresión relativa del ARNm de *LvPcna* y ADN pol viral en camarones infectados con el WSSV. Panel A) WSSV ADN pol expresión mRNA, letras en *cursiva* significan diferencia ($p < 0.05$) entre cada tiempo; *n.d.*, no detectado. Panel B) Expresión relativa del *LvPCNA*. La expresión se normalizó con respecto al gen L8.

IX. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

El marco de lectura ORF514 codifica para una enzima que tiene actividad *exonucelasa* y *polimerasa*, con un bajo rendimiento en la incorporación de nucleótidos, sugiriendo que necesita de una pinza con la cual mantenerse unida a la cadena de ADN. En este trabajo se caracterizó la región catalítica de la polimerasa donde se encontraron los dominios correspondientes. Además se localizó la caja PIP en la superficie de la polimerasa, la cual podría jugar un importante rol en la replicación del ADN viral, pudiendo utilizar la pinza del huésped. Todo esto nos indica que el ORF 514 codifica para una enzima con actividad polimerasa, dejando de lado la nomenclatura de “*putativo*” y cambiando a una enzima como tal “*polimerasa*”.

Se obtuvo la secuencia completa del *LvPCNA*, donde se pudieron identificar los dominios involucrados en la interacción ADN/PCNA/Polimerasa. Así mismo se logró detectar la expresión del gen en músculo infectado y se pudo ver una tendencia en la cual disminuye la expresión del gen, pero manteniéndose a lo largo de la infección.

Se recomienda hacer más experimentos de purificación de la WSSV ADN polimerasa utilizando cromatografía de afinidad a metales (IMAC). También se recomienda hacer ensayo de actividad con más proteína para poder ver una banda más definida en la detección. Para el *LvPCNA* se necesita purificar proteína para poder realizar ensayo de actividad de polimerasa y ver si la adición de este factor de procesividad le confiere una mayor incorporación de nucleótidos a la cadena molde de ADN. Así mismo se recomienda hacer ensayos de retraso en migración (EMSA), para ver el complejo ADN polimerasa/PCNA.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2002). "Molecular biology of the cell, Bruce Alberts...[et al.]."
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Bebenek, K. y Kunkel, T. A. (2004). "Functions of DNA polymerases." Adv Protein Chem **69**: 137-65.
- Berkhout, B. y Haasnoot, J. (2006). "The interplay between virus infection and the cellular RNA interference machinery." FEBS letters **580**(12): 2896-2902.
- Berman, A. J., Kamtekar, S., Goodman, J. L., Lázaro, J. M., De Vega, M., Blanco, L., Salas, M. y Steitz, T. A. (2007). "Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases." The EMBO Journal **26**(14): 3494-3505.
- Boehmer, P. E. y Lehman, I. R. (1997). "Herpes simplex virus DNA replication." Annual Review of Biochemistry **66**(1): 347-384.
- Brautigam, C. A. y Steitz, T. A. (1998). "Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes." Current Opinion in Structural Biology **8**(1): 54-63.
- Briebe, L. G., Eichman, B. F., Kokoska, R. J., Double, S., Kunkel, T. A. y Ellenberger, T. (2004). "Structural basis for the dual coding potential of 8-oxoguanosine by a high-fidelity DNA polymerase." Embo Journal **23**(17): 3452-3461.
- Bustillo-Ruiz, M. I., Escobedo-Bonilla, C. M. y Sotelo-Mundo, R. R. (2009). "Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca en camarones peneidos." Rev. Biol. Mar. Oceanografía 1-11.
- Caspar, D. L. D. y Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Chaudhuri, M. y Parris, D. S. (2002). "Evidence against a simple tethering model for enhancement of herpes simplex virus DNA polymerase processivity by accessory protein UL42." The Journal of Virology **76**(20): 10270.
- Chen, L. L., Wang, H. C., Huang, C. J., Peng, S. E., Chen, Y. G., Lin, S. J., Chen, W. Y., Dai, C. F., Yu, H. T. y Wang, C. H. (2002). "Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus." Virology **301**(1): 136-147.
- Clavero-Salas, A., Sotelo-Mundo, R. R., Gollas-Galvan, T., Hernandez-Lopez, J., Peregrino-Uriarte, A. B., Muhlia-Almazan, A. y Yepiz-Plascencia, G. (2007). "Transcriptome analysis of gills from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with White Spot Syndrome Virus." Fish & Shellfish Immunology **23**(2): 459-472.
- de-la-Re-Vega, E., Garcia-Galaz, A., Diaz-Cinco, M. E. y Sotelo-Mundo, R. R. (2006). "White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial

- activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahemolyticus* and *Vibrio cholerae*." *Fish Shellfish Immunol* **20**(3): 405-8.
- De Clercq, E. (2003a). "Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections." *Clin Microbiol Rev* **16**(4): 569-96.
- De Clercq, E. (2003b). "Potential of acyclic nucleoside phosphonates in the treatment of DNA virus and retrovirus infections." *Expert Rev Anti Infect Ther* **1**(1): 21-43.
- De Clercq, E. (2007). "Acyclic nucleoside phosphonates: Past, present and future:: Bridging chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, adeno-, herpes-, and poxvirus infections: The phosphonate bridge." *Biochemical Pharmacology* **73**(7): 911-922.
- De Clercq, E. y Holý, A. (2005). "Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs." *Nature Reviews Drug Discovery* **4**(11): 928-940.
- DeLano, W. L. (2002). "The PyMOL molecular graphics system."
- Dieu, B. T. M., Marks, H., Siebenga, J. J., Goldbach, R. W., Zuidema, D., Duong, T. P. y Vlak, J. M. (2004). "Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam." *Journal of General Virology* **85**(12): 3607.
- Dieu, B. T. M., Marks, H., Zwart, M. P. y Vlak, J. M. (2010). "Evaluation of white spot syndrome virus variable DNA loci as molecular markers of virus spread at intermediate spatiotemporal scales." *Journal of General Virology* **91**(5): 1164.
- Digard, P., Bebrin, W. R., Weisshart, K. y Coen, D. M. (1993). "The extreme C terminus of herpes simplex virus DNA polymerase is crucial for functional interaction with processivity factor UL42 and for viral replication." *Journal of Virology* **67**(1): 398.
- Flegel, T. W. (1997). "Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**(4): 433-442.
- Flegel, T. W. (2006). "Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand." *Aquaculture* **258**(1-4): 1-33.
- Foster, K. A., Barnes, M. H., Stephenson, R. O., Butler, M. M., Skow, D. J., LaMarr, W. A. y Brown, N. C. (2003). "DNA polymerase III of *Enterococcus faecalis*: expression and characterization of recombinant enzymes encoded by the polC and dnaE genes." *Protein Expr Purif* **27**(1): 90-7.
- Franklin, M. C., Wang, J. y Steitz, T. A. (2001). "Structure of the replicating complex of a pol [alpha] family DNA polymerase." *Cell* **105**(5): 657-667.
- Fukuda, K., Morioka, H., Imajou, S., Ikeda, S., Ohtsuka, E. y Tsurimoto, T. (1995). "Structure-function relationship of the eukaryotic DNA replication factor, proliferating cell nuclear antigen." *Journal of Biological Chemistry* **270**(38): 22527.
- Georgescu, R. E., Kim, S. S., Yurieva, O., Kuriyan, J., Kong, X. P. y O'Donnell, M. (2008). "Structure of a sliding clamp on DNA." *Cell* **132**(1): 43-54.
- Granja, C. B., Vidal, O. M., Parra, G. y Salazar, M. (2006). "Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*." *Diseases of Aquatic Organisms* **68**(2): 175.

- Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. y Kuriyan, J. (1996). "Structure of the C-terminal region of p21WAF1/CIP1 complexed with human PCNA." Cell **87**(2): 297-306.
- Huber, H. E., Tabor, S. y Richardson, C. C. (1987). "Escherichia coli thioredoxin stabilizes complexes of bacteriophage T7 DNA polymerase and primed templates." Journal of Biological Chemistry **262**(33): 16224.
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F. y Boyer, H. W. (1977). "Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin." Science **198**(4321): 1056.
- Johnson, A. y O'Donnell, M. (2005a). "Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork." Annu. Rev. Biochem. **74**: 283-315.
- Johnson, A. y O'Donnell, M. (2005b). "Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork." Biochemistry **74**(1): 283.
- Joyce, C. M. y Steitz, T. A. (1995). "Polymerase structures and function: variations on a theme?" Journal of Bacteriology **177**(22): 6321.
- Kelman, Z. (1997). "PCNA: structure, functions and interactions." Oncogene **14**(6): 629.
- Kornberg, A. (1984). "DNA replication." Trends in Biochemical Sciences **9**(4): 122-124.
- Li, P., Zha, J., Kong, Y., Chen, C., Sun, H., Song, D. y Zhou, K. (2010). "Identification, mRNA expression and characterization of proliferating cell nuclear antigen gene from Chinese mitten crab *Eriocheir japonica sinensis*." Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology.
- Liu, H., Söderhäll, K. y Jiravanichpaisal, P. (2009). "Antiviral immunity in crustaceans." Fish & Shellfish Immunology **27**(2): 79-88.
- Liu, S. P., Knafels, J. D., Chang, J. S., Waszak, G. A., Baldwin, E. T., Deibel, M. R., Thomsen, D. R., Homa, F. L., Wells, P. A., Tory, M. C., Poorman, R. A., Gao, H., Qiu, X. Y. y Seddon, A. P. (2006). "Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase." Journal of Biological Chemistry **281**(26): 18193-18200.
- Liu, W. J., Yu, H. T., Peng, S. E., Chang, Y. S., Pien, H. W., Lin, C. J., Huang, C. J., Tsai, M. F. y Wang, C. H. (2001). "Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of a shrimp white spot syndrome virus gene that encodes a protein kinase." Virology **289**(2): 362-377.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ method." Methods **25**(4): 402-408.
- Ma, C., Tang, Z., Wang, K., Tan, W., Yang, X., Li, W., Li, Z., Li, H. y Lv, X. (2007). "Real-time monitoring of nucleic acid dephosphorylation by using molecular beacons." ChemBiochem **8**(13): 1487-90.
- Maga, G. y Hubscher, U. (2003). "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners." Journal of Cell Science **116**(Pt 15): 3051.
- McNally, R., Bowman, G. D., Goedken, E. R., O'Donnell, M. y Kuriyan, J. (2010). "Analysis of the role of PCNA-DNA contacts during clamp loading." BMC Structural Biology **10**(1): 3.

- Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A. y Ebert, M. H. (1981). "Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins." Science **211**(4489): 1437-8.
- Mul, Y. M., van Miltenburg, R. T., De Clercq, E. y van der Vliet, P. C. (1989). "Mechanism of inhibition of adenovirus DNA replication by the acyclic nucleoside triphosphate analogue (S)-HPMPApp: influence of the adenovirus DNA binding protein." Nucleic Acids Res **17**(22): 8917-29.
- Natividad, K. D. T., Nomura, N. y Matsumura, M. (2008). "Detection of White spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step nested PCR." Journal of Virological Methods **149**(1): 28-34.
- Nunan, L. M., Poulos, B. T. y Lightner, D. V. (1998). "The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp." Aquaculture **160**(1-2): 19-30.
- Öberg, B. (2006). "Rational design of polymerase inhibitors as antiviral drugs." Antiviral Research **71**(2-3): 90-95.
- Pikul Jiravanichpaisal, K. S., Irene Soderhall (2004). "Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish." Fish & Shellfish Immunology **17**: 265-275.
- Roth, B. (1986). "Design of dihydrofolate reductase inhibitors from X-ray crystal structures." Fed Proc **45**(12): 2765-72.
- Rothwell, P. J. y Waksman, G. (2005). "Structure and mechanism of DNA polymerases." Adv Protein Chem **71**: 401-440.
- Sánchez-Paz, A. (2010). "White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern." Veterinary Research **41**(6).
- Sánchez Martínez, J. G., Aguirre Guzmán, G. y Mejía Ruíz, H. (2007). "White spot syndrome virus in cultured shrimp: a review." Aquaculture Research **38**(13): 1339-1354.
- Schlicke, M. y Brakmann, S. (2005). "Expression and purification of histidine-tagged bacteriophage T7 DNA polymerase." Protein Expression and Purification **39**(2): 247-253.
- Schmittgen, T. D. y Livak, K. J. (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method." Nature Protocols **3**(6): 1101-1108.
- Seybert, A., Scott, D. J., Scaife, S., Singleton, M. R. y Wigley, D. B. (2002). "Biochemical characterisation of the clamp/clamp loader proteins from the euryarchaeon *Archaeoglobus fulgidus*." Nucleic Acids Research **30**(20): 4329.
- Steitz, T. A. (1999). "DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms." Journal of Biological Chemistry **274**(25): 17395.
- Tang, X., Wu, J., Sivaraman, J. y Hew, C. L. (2007). "Crystal structures of major envelope proteins VP26 and VP28 from white spot syndrome virus shed light on their evolutionary relationship." J Virol **81**(12): 6709-17.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." Nucleic Acids Research **25**(24): 4876.

- Tori, K., Kimizu, M., Ishino, S. y Ishino, Y. (2007). "DNA polymerases BI and D from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* both bind to proliferating cell nuclear antigen with their C-terminal PIP-box motifs." Journal of Bacteriology **189**(15): 5652.
- Tsai, J. M., Wang, H. C., Leu, J. H., Hsiao, H. H., Wang, A. H. J., Kou, G. H. y Lo, C. F. (2004). "Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus." Journal of Virology **78**(20): 11360.
- Tsurimoto, T. (1998). "PCNA, a multifunctional ring on DNA." Biochimica et Biophysica Acta **1443**(1-2): 23.
- van Hulten, M. C., Tsai, M. F., Schipper, C. A., Lo, C. F., Kou, G. H. y Vlak, J. M. (2000). "Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions." J Gen Virol **81**(Pt 2): 307-16.
- van Hulten, M. C. W., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R. K. y Vlak, J. M. (2001). "The white spot syndrome virus DNA genome sequence." Virology **286**(1): 7-22.
- Vijayakumar, S., Chapados, B. R., Schmidt, K. H., Kolodner, R. D., Tainer, J. A. y Tomkinson, A. E. (2007). "The C-terminal domain of yeast PCNA is required for physical and functional interactions with Cdc9 DNA ligase." Nucleic Acids Research **35**(5): 1624.
- Warbrick, E. (1998). "PCNA binding through a conserved motif." Bioessays **20**(3): 195-199.
- Weisshart, K., Chow, C. S. y Coen, D. M. (1999). "Herpes simplex virus processivity factor UL42 imparts increased DNA-binding specificity to the viral DNA polymerase and decreased dissociation from primer-template without reducing the elongation rate." The Journal of Virology **73**(1): 55.
- Wu, C. y Yang, F. (2006). "Localization studies of two white spot syndrome virus structural proteins VP51 and VP76." Virol. J **3**: 76.
- Xiang, Z. (2006). "Advances in homology protein structure modeling." Current Protein & Peptide Science **7**(3): 217.
- Xie, Y., Wang, B., Li, F., Jiang, H. y Xiang, J. (2008). "Molecular cloning and characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **151**(2): 225-229.
- Yi, G., Wang, Z., Qi, Y., Yao, L., Qian, J. y Hu, L. (2004). "Vp28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells." Journal of Biochemistry and Molecular Biology **37**(6): 726.
- Zhang, Z., Shen, B., Wang, Y., Chen, Y., Wang, G., Lin, P. y Zou, Z. (2010). "Molecular Cloning of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Its Differential Expression Analysis in the Developing Ovary and Testis of Penaeid Shrimp *Marsupenaeus japonicus*." DNA and Cell Biology **29**(4): 163-170.

ANEXOS

ANEXO I

Enrique de-la-Re-Vega, Karina D. Garcia-Orozco, Aldo A. Arvizu-Flores,
Gloria Yepiz-Plascencia, Adriana Muhlia-Almazan, Jesús Hernández, Luis G. Briebe,
Rogerio R. Sotelo-Mundo. *Molecules* **2011**, *16*, 532-542;
doi:10.3390/molecules16010532

Article

WHITE SPOT SYNDROME VIRUS ORF514 ENCODES A *BONA FIDE* DNA POLYMERASE

Enrique de-la-Re-Vega¹, Karina D. Garcia-Orozco¹, Aldo A. Arvizu-Flores², Gloria Yepiz-Plascencia¹, Adriana Muhlia-Almazan¹, Jesús Hernández¹, Luis G. Briebe^{3,4*}, Rogerio R. Sotelo-Mundo^{1*}

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Carretera a Ejido La Victoria Km 0.6, Apartado Postal 1735, Hermosillo, Sonora, 83000 México

² Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Col. Centro, Hermosillo, Sonora, 83000 México

³ Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV Campus Guanajuato) Km 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León; Apartado Postal 629; Irapuato, Guanajuato, 36500 México

⁴ Howard Hughes Medical Institute (HHMI), International Scholar

* Authors to whom correspondence should be addressed; Rogerio R. Sotelo-Mundo, PhD. Aquatic Molecular Biology Lab, CIAD (rrs@ciad.mx) Tel.: +52-662-289-2400 ext 352; Luis G. Briebe, PhD. CINVESTAV, HHMI (lgbriebe@ira.cinvestav.mx) Tel.: +52-462-6239-663

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) is the causative agent of white spot syndrome, one of the most devastating diseases in shrimp aquaculture. The genome of WSSV includes a gene that encodes a putative family B DNA polymerase (ORF514), which is 16% identical in amino acid sequence to the Herpes virus 1 DNA polymerase. The aim of this work was to demonstrate the activity of the WSSV ORF514-encoded protein as a DNA polymerase and hence a putative antiviral target. A 3.5 kbp fragment encoding the conserved polymerase and exonuclease domains of ORF514 was heterologously overexpressed and purified from bacteria. The recombinant protein showed polymerase activity but with very low level of processivity. Molecular modeling of the catalytic protein core encoded in ORF514 revealed a canonical polymerase fold. Amino acid sequence alignments of ORF145 indicate the presence of a putative PIP box, suggesting that the encoded putative DNA polymerase may use a host processivity factor

for optimal activity. We postulate that WSSV ORF514 encodes a *bona fide* DNA polymerase that requires accessory proteins for activity and maybe target for drugs or compounds that inhibit viral DNA replication.

Keywords: DNA polymerase family B; WSSV, white spot syndrome virus; polymerase activity; Crustacea; shrimp; prawn; *Litopenaeus vannamei*; decapoda; invertebrate.

Abbreviations: ORF514, ORF27, open reading frame; WSSV DNA pol, white spot syndrome virus DNA polymerase; PMSF, phenyl methylsulphonyl fluoride; IPTG isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; DTT, dithiothreitol.

1. Introduction

The white spot syndrome virus (WSSV) is the causative agent of the white spot syndrome, which is the most serious viral disease of cultured shrimp in the world [1]. Since 1993, this virus has been found in most of the shrimp farming regions in South Asia, Europe, Australia and Latin America. WSSV is highly lethal and represents the most important threat for shrimp aquaculture industry [2]. The WSSV genome is completely sequenced and it contains ORFs corresponding to enzymes involved in nucleic acid metabolism [3]. The WSSV enzymes involved in DNA replication and characterized to date are ribonucleotide reductase (RR) [4], dUTPase, a chimeric thymidine kinase-thymidylate kinase (TK-TMK) [4], and thymidylate synthase [5]. The WSSV ORF514* is 7056 nucleotides long and encodes for a 2351 amino acids polypeptide (262 kDa), that is classified as a putative family B DNA polymerase [6]. Although the ORF514 amino acid sequence contains only 16% identity to the herpes simplex virus DNA polymerase 1 (HSV). The polymerase (*pol*) and exonuclease (*exo*) domains of family B DNA polymerases are easily identified using bioinformatic tools.

Expression of ORF514 has been detected very rapidly after WSSV virus infection, since the viral transcript is present as early as 2 h after viral infection [6]. However, the biochemical function of the gene product encoded in ORF514 has not been experimentally demonstrated yet. Thus, the aim of this work was to produce and purify the recombinant protein encoded by the WSSV ORF514 and to evaluate its polymerase activity. Since family B DNA polymerases are drug targets, ORF514 may be a potential target for antiviral therapy against WSSV.

2. Results and Discussion

2.1. WSSV ORF514 contains the functional domains of a family B DNA polymerase

WSSV ORF514 encodes a putative protein of 261 kDa that belongs to the family B DNA polymerases. ORF514 is unusually long. This unusual length is due to non-conserved additional sequences in its amino and carboxy terminal ends. The central region of the ORF514, from residue 674

* In early literature, ORF514 is also known as ORF27, both corresponding to a putative WSSV DNA polymerase.

to 177, encodes a putative DNA polymerase with the conserved *exo* and *pol* DNA polymerase family B domains (Figure 1).

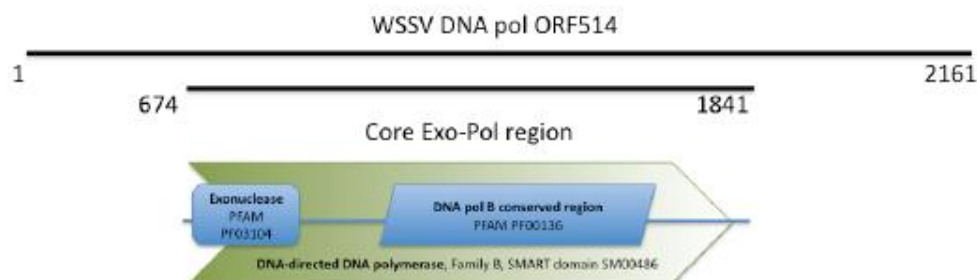


Figure 1. Domain structure of the core region of the WSSV ORF514. The domains identified in the sequence include the reference number either to the PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk>) or SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) domain.

To illustrate if the selected core region contained functional domains of family B DNA polymerases, the amino acid sequence of the WSSV ORF514 core region was modeled on a closed DNA-bound conformation using the HSV 1 DNA polymerase crystal structure as a template (PDB: 2GV9). The *pol* and *exo* domains were identified in the theoretical model (Figure 2a).

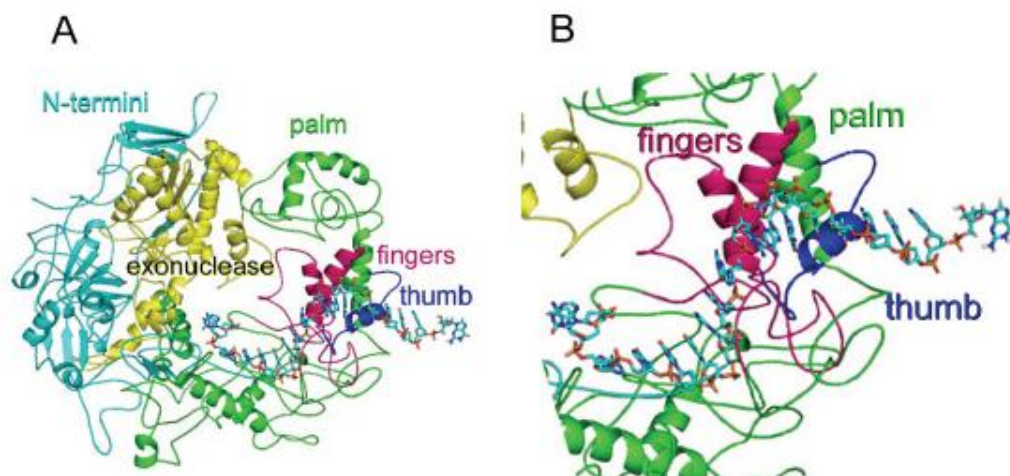


Figure 2. Molecular model of the core region of WSSV ORF514. (a) The sub domains were colored as follows: finger in magenta, thumbs in blue, palm in green. The domains were colored as follows: exonuclease in yellow, N-termini in cyan. (b) Close up to the active site where the fingers, palm and thumb are depicted.

The *pol* domain (Figure 2b) is divided in three sub domains: the fingers (magenta), that interact with the incoming nucleoside triphosphate and the template; the thumb (blue), which is involved in positioning the DNA duplex, processivity and translocation; and the palm (green), that is involved in the phosphoryl transfer reaction [7, 8]. The *exo* domain (yellow) is responsible for replication fidelity. The model fitted the classical hand shape of a DNA polymerase: a “right hand holding the DNA”. Several conserved basic residues were identified in the finger subdomain at the active site in contact with the phosphate moieties of DNA template. The acidic residues, which are required for catalysis of the incoming triphosphate, at the palm subdomain were also identified in the structural model, suggesting that our model is in good agreement with the topological structure of DNA polymerases. The DNA pol encoded by ORF514 in WSSV genome has several insertions with respect to other DNA polymerases known to date. These sequences are found mainly at loop regions of the theoretical model and many of them adopted secondary structure elements in a consistently form within several independent models.

2.2 WSSV ORF514 has polymerase activity

This core domain was selected for recombinant expression, since other viral DNA polymerases are functional having only the *pol* and *exo* domains. For the biochemical characterization of the WSSV ORF514-encoded protein, the core region was produced as a recombinant protein in bacteria. Recombinant expression of the ORF514 viral coding region at 16°C led to very low yields of a soluble protein (data not shown). To increase yields, a synthetic gene with optimized codons for expression in bacteria still produced low yields but enough for biochemical characterization (100 µg of purified protein per 1 lt bacterial culture). The WSSV DNA polymerase encoded in ORF514 was detected as a 140 kDa polypeptide in native polyacrylamide electrophoresis (Figure 3) and its polymerase activity was shown.

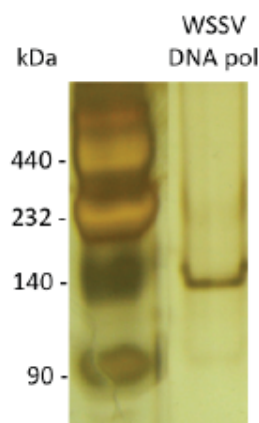


Figure 3. Purification of WSSV DNA pol. Native silver-stained gel of purified WSSV DNA pol.

The recombinant WSSV core ORF514 protein was tested for DNA polymerase activity (Figure 4) with the non-radioactive polymerase activity assay. Under the experimental condition, recombinant WSSV incorporated 24 nt in 16 min, similarly to the control DNA polymerase (Klenow fragment) that incorporated the 24 nt in 2 min (lane +). These results indicate that ORF514 encodes a *bona fide* viral DNA polymerase, and the low rate of incorporation observed *in vitro* suggests that this polymerase may require accessory proteins for enhanced processivity.

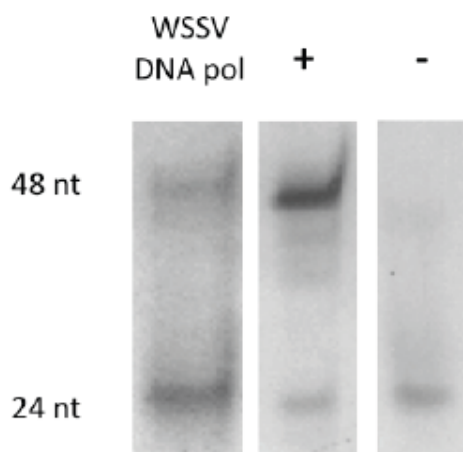


Figure 4. Polymerase activity of the recombinant WSSV DNA pol. WSSV DNA pol was tested in a nucleotide incorporation assay using Klenow polymerase deficient in exonuclease activity as positive control. No polymerase was added for the negative control.

The DNA polymerase processivity factor or sliding clamp in known replication systems allows the core polymerase to remain associated to the DNA template and increase the rate of nucleotide incorporation [9]. The HSV UL42 protein increases the processivity and elongation rate of the herpes DNA polymerase, and requires a specific amino acid region in the DNA polymerase for protein-protein interactions [9-11]. Also, complementation of the DNA polymerase of *Archaeoglobus fulgidus* with clamp/clamp replication factor C and proliferating cell nuclear antigen (RFC/PCNA) is needed to increase the processivity of the archeal polymerase [12].

2.3 Interaction with host replication factors

Structural features found in the WSSV DNA polymerase molecular model include invariant residues in the fingers subdomain (Figure 5a). Although the overall identity with the HSV DNA pol is 16 %, the finger region contains invariant residues R1387, S1453 and T1455 from humans to yeast and HSV. The finger subdomain appears as the element that holds the double helix DNA during replication.

Since many polymerases are known to require processivity factors, analysis of the core WSSV DNA polymerase for possible binding sites to these proteins was done. A PIP box [13] was identified within the linear amino acid sequence and also in the structural model (Figure 5b). PIP box appears in

the accessible surface of the model (in red), predicting that such host factors may bind and increase nucleotide incorporation rates.

The PIP box domain consists of the sequence QxxHxxA, where “x” is any amino acid, “H” represents a hydrophobic residue and “A” represents an aromatic residue [13, 14] (Figure 5b). The PIP box, which is a short amino acid sequence found in many polymerases, allows interaction between the DNA polymerase and PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) to form the replication complex. DNA polymerase performs a processive DNA synthesis only when bound to PCNA among other processivity factors [14]. The WSSV ORF514 amino acid sequence contains the sequence ⁶⁸⁰QHKILYY⁶⁸⁶, which corresponds to the PIP box, hence, is likely that the viral DNA polymerase uses the host cell processivity factor. An analogous situation is present in T7 DNA replication in which T7 DNA polymerase uses the host *E. coli* thioredoxin as processivity factor. [15] Recently, the PCNA from the shrimp has been identified [16], confirming the presence of this accessory replication factor in the shrimp genome.

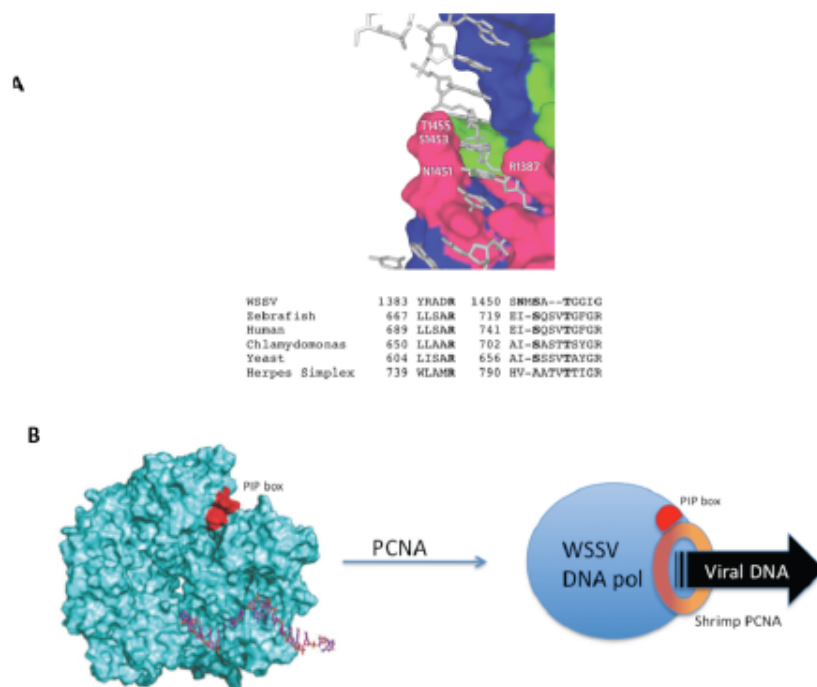


Figure 5. A proposal for a processive complex for WSSV viral replication. **(a)** Conserved residues of the finger domain are depicted, and sequence alignment shows the degree of sequence conservation. The sequences correspond to the following GenBank accession numbers: WSSV: AAK77696ORF27; Zebrafish: *Danio rerio* AAI63875; Human ABB29977; *Chlamydomonas reinhardtii* XP_001689909. For yeast and herpes the sequences were obtained from the Protein Data Base: Yeast: *Saccharomyces cerevisiae* PDB3IAY; Herpes Simplex Virus Type 1: 2GV9. **(b)** To the left, the molecular model of WSSV core DNA pol, showing bound DNA and the PIP box, a site where PCNA binds.

Considering the limited resolution of protein modeling is remarkable that the residues adopted the cognate finger conformation; nonetheless, a crystal structure of this protein in complex with DNA would be the way forward to further understand the actual mechanism of WSSV viral DNA replication.

3. Experimental Section

3.1 Materials

Escherichia coli strain TOP10 (Stratagene, La Jolla CA, USA) was used for DNA cloning. *E. coli* BL21 Rosetta Novagen (San Diego CA, USA), was used for the over expression of the 3.5 Kb ORF514. Synthetic gene services and vector pJexpress401 were from DNA 2.0 (Menlo Park, CA, USA). Chromatography columns were from GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA), labeled primers were from IDT (Coralville, IA, USA).

3.2 WSSV ORF514 expression construct

The WSSV ORF514 coding region (GenBank AAK77696.1) containing the putative polymerase and exonuclease domains was used for the design of the synthetic gene. The synthetic amino acid terminal sequence started with a methionine residue followed by a six-histidine residues tag and by the fragment of the ORF514 (from residues M674 to V1841), which contain the polymerase and exonuclease domains. The nucleotide sequence of the construct was optimized for its expression in *E. coli* [17], synthesized and cloned in-frame within the expression vector pJexpress401 by DNA 2.0 (Menlo Park, CA, USA). This vector contains the T7 promoter for functional expression in the *E. coli* BL21(DE3) strain.

3.3 Recombinant expression of WSSV ORF514

The pJexpress401-WSSVORF514 synthetic construct was used to transform BL21(DE3) Rosetta *E. coli* cells. Cells were grown in 1 L TB media at 37°C to an optical density of 0.5-0.6 (OD₅₀₀), and IPTG was added at a final concentration of 0.1 mM. Recombinant expression of WSSV DNA pol was allowed for 4 h post-induction. From this point all subsequent steps were carried out at 4°C. Cells were harvested by centrifugation at 5000 x g for 15 min, washed with 0.1% saline and then sonicated in 25 mM glycine, 1 mM PMSF, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 9.0 at a ratio of 8 ml per g pellet in ice bath. The soluble protein was recuperated by centrifugation at 10000 x g for 20 min. The supernatant containing the expressed WSSV ORF514 was treated with streptomycin solution (5 %) in a ratio of 15 ml per 100 mL of supernatant and recuperated by centrifugation at 10000 x g for 20 min. Then, the recombinant protein encoded in WSSV ORF514 was precipitated with ammonium sulfate (40 %). The pellet was then dissolved and dialyzed overnight against buffer C (25 mM glycine, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 9.0).

3.4 WSSV ORF514 protein purification

The recombinant protein was not amenable for purification using IMAC by the poly-histidine tag (data not shown). Therefore, a traditional purification scheme was applied, using anionic exchange chromatography with a DEAE FF HiTrap column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Elution of the WSSV DNA pol was done with a linear gradient of NaCl to 1 M in running buffer C. A second step of chromatographic purification was done using phosphocelulose (Whatman GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), equilibrated with buffer C and eluted with buffer C plus 100 mM NaCl. A third step of purification was done using gel filtration chromatography in a 10 x 300 mm Biogel P150 column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with buffer C plus 200 mM NaCl. Fractions containing the WSSV ORF514 encoded protein were concentrated using a Centricon Plus PL-30 (Millipore, Billerica, MA, USA). Fractions were analyzed by SDS-PAGE (8%) and stained with Coomassie Blue R-250.

3.5 DNA polymerase activity assay

A nucleotide incorporation assay was used to demonstrate the DNA polymerase activity of the recombinant protein encoded in ORF514. A 24-mer primer (oligo A; 5'-CGCAGCCCACCTGCCCACCTAACT-3') was 5'-labeled with digoxigenin (DIG) and hybridized to a template strand (oligo B; 5'-CCTTGGCACTAGCGCAGGGCAAGTTAGGTGGCAGGTGGGCTGCG-3'). This is a non-isotopic implementation of the radioactive polymerase assay previously reported [18]. Since oligo A was synthesized with the DIG label, no labeling reaction was required. The hybridization of the DIG-oligo A with oligo B was done by mixing 2.2 μ L and 3.2 μ L of oligo A and oligo B (3 nM solutions) in a final volume of 100 μ L of water. The reaction was incubated at 95°C for 5 min and slowly cooled down for 2 h at room temperature. The activity reaction contained 2.8 pM of the hybridized template, 25 μ M each dNTP, 0.176 nM of WSSV DNA pol in a reaction buffer of 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5; the DNA polymerase I (Klenow fragment) was used as a positive control reaction. The reactions were incubated at 37°C for 8-16 min and terminated by adding an equal volume of formamide stop solution (95 % formamide, 25 mM EDTA, 0.1 % xylene cyanol, 0.01 % bromophenol blue). The DNA products were separated on 18 % denaturing polyacrylamide gels, containing 8 M urea. To detect the DNA products labeled with DIG, the gels were transferred to a Hybond membrane using a semi-dry blotter (Bio-Rad) at 25 volts for 30 min, using 0.5x TBE buffer to wet the membrane. The transferred DNA was fixed to the membrane by crosslinking with a mini UV oven for 30 s at 12,000 μ J. The membrane was rinsed with washing buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3 % Tween 20, pH 7.5) and blocked with blocking solution (Roche blocking reagent), for 30 min. Then, the membrane was incubated for 1 h with alkaline phosphatase labeled anti-DIG diluted 1:20 000 in blocking solution, and then washed twice with buffer for 15 min. Color detection was done with NBT/BCIP (Nitro Blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) according to the manufacturer (Bio-Rad).

3.6 WSSV DNA ORF514 encoded DNA polymerase molecular modeling

The homology modeling of the WSSV DNA polymerase encoded in ORF514 was done by superimposing the deduced core *exo* and *pol* domains in ORF514 amino acid sequence into the known crystallographic structure of the Herpes virus family B DNA polymerase type 1 (PDB: 2GV9) [19]

using MOE 209.10 (ChemComp, Montreal, Canada). The coordinates of DNA template and primer in complex with the enzyme were taken from the crystallographic structure of phage RB69 DNA pol replicating complex (PDB: 1IG9) [20] and included in the construction of the WSSV DNA pol model. The assignment of the WSSV DNA polymerase domains and figures of the resulting structure were drawn with PyMOL 1.0 [21].

4. Conclusions

WSSV ORF514 encodes an enzyme with *exo* and *pol* activities, and low rates of DNA incorporation suggests that a sliding clamp complex is needed to keep the DNA polymerase associated to the template during viral DNA synthesis. In this work, the characterization of the core region of the ORF containing the catalytic domains is presented. Moreover, the localization of the PIP box into the surface of the WSSV DNA polymerase structural model suggests the recruitment of shrimp replication factors.

Although the role of a DNA polymerase in viral replication is evident, two results must be presented in perspective. In one work the WSSV putative DNA polymerase was silenced using RNA interference [22]. In this case at days post-challenge, the relative survival rates of shrimp injected with dsRNA-*dna pol* was 50%. A cause for this result may be related to viral mRNA stability and protein stability, in which elimination of message does not abrogate viral DNA synthesis. Also, the expression profile has been studied, and DNA polymerase is expressed 6 h to 60 h post-infection [6]. Availability of the recombinant protein will allow production of antibodies to follow protein and mRNA levels and to further understand DNA polymerase dynamics.

Another issue critical to DNA replication is the availability of deoxynucleotides. *De novo* nucleotide synthesis is represented by thymidylate synthase, which is present in shrimp and WSSV [5]. The other pathway involves nucleotide salvage, where thymidine kinase is the key enzyme and is also present in WSSV and very likely also in shrimp genome [23]. Therefore, in the absence of stable crustacean cell lines, a biochemical approach for understanding WSSV replication may be the way to follow toward the development of antiviral therapies for this emerging disease.

Acknowledgements

E. de-la-Re-Vega thanks CONACYT for a doctoral scholarship, and R. Sotelo-Mundo thanks a grant from CONACyT (National Research Council for Science and Technology) and CIAD. A. Arvizu-Flores thanks “Apoyos Complementarios para la Consolidación Institucional de Grupos de Investigación: Retención 121269” for support for molecular modeling software. We thank Dr. Maria Islas-Osuna for critical reading, Mariana Rodríguez-Armenta for technical assistance. L. Brieba acknowledges support from LANGEBIO’s intramural funds.

References and Notes

1. Liu, H.; Soderhall, K.; Jiravanichpaisal, P., Antiviral immunity in crustaceans. *Fish & Shellfish Immunology* 2009, 27, (2), 79-88.

2. Sanchez-Paz, A., White spot syndrome virus: An overview on an emergent concern. *Veterinary Research* **2010**, *41*, (6), 43.
3. van Hulten, M. C.; Witteveldt, J.; Peters, S.; Kloosterboer, N.; Tarchini, R.; Fiers, M.; Sandbrink, H.; Lankhorst, R. K.; Vlak, J. M., The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* **2001**, *286*, (1), 7-22.
4. Tsai, J. M.; Wang, H. C.; Leu, J. H.; Wang, A. H.; Zhuang, Y.; Walker, P. J.; Kou, G. H.; Lo, C. F., Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *Journal of Virology* **2006**, *80*, (6), 3021-9.
5. Arvizu-Flores, A. A.; Aispuro-Hernandez, E.; Garcia-Orozco, K. D.; Varela-Romero, A.; Valenzuela-Soto, E.; Velazquez-Contreras, E. F.; Rojo-Dominguez, A.; Yepiz-Plascencia, G.; Maley, F.; Sotelo-Mundo, R. R., Functional identity of the active sites of crustacean and viral thymidylate synthases. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **2009**, *150C*, (3), 406-413.
6. Chen, L. L.; Wang, H. C.; Huang, C. J.; Peng, S. E.; Chen, Y. G.; Lin, S. J.; Chen, W. Y.; Dai, C. F.; Yu, H. T.; Wang, C. H., Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* **2002**, *301*, (1), 136-147.
7. Joyce, C. M.; Steitz, T. A., Polymerase structures and function: variations on a theme? *Journal of Bacteriology* **1995**, *177*, (22), 6321.
8. Steitz, T. A., DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, (25), 17395.
9. Chaudhuri, M.; Parris, D. S., Evidence against a simple tethering model for enhancement of herpes simplex virus DNA polymerase processivity by accessory protein UL42. *Journal of Virology* **2002**, *76*, (20), 10270.
10. Digard, P.; Bebrin, W. R.; Weisshart, K.; Coen, D. M., The extreme C terminus of herpes simplex virus DNA polymerase is crucial for functional interaction with processivity factor UL42 and for viral replication. *Journal of Virology* **1993**, *67*, (1), 398.
11. Weisshart, K.; Chow, C. S.; Coen, D. M., Herpes simplex virus processivity factor UL42 imparts increased DNA-binding specificity to the viral DNA polymerase and decreased dissociation from primer-template without reducing the elongation rate. *Journal of Virology* **1999**, *73*, (1), 55.
12. Seybert, A.; Scott, D. J.; Scaife, S.; Singleton, M. R.; Wigley, D. B., Biochemical characterisation of the clamp/clamp loader proteins from the euryarchaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30*, (20), 4329.
13. Warbrick, E., PCNA binding through a conserved motif. *BioEssays* **1998**, *20*, (3), 195-9.
14. Tori, K.; Kimizu, M.; Ishino, S.; Ishino, Y., DNA polymerases BI and D from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* both bind to proliferating cell nuclear antigen with their C-terminal PIP-box motifs. *Journal of Bacteriology* **2007**, *189*, (15), 5652-7.
15. Huber, H. E.; Tabor, S.; Richardson, C. C., *Escherichia coli* thioredoxin stabilizes complexes of bacteriophage T7 DNA polymerase and primed templates. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, (33), 16224.

16. Xie, Y.; Wang, B.; Li, F.; Jiang, H.; Xiang, J., Molecular cloning and characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from Chinese shrimp *Penaeus chinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* **2008**, 151B, (2), 225-9.
17. Welch, M.; Govindarajan, S.; Ness, J. E.; Villalobos, A.; Gurney, A.; Minshull, J.; Gustafsson, C., Design parameters to control synthetic gene expression in *Escherichia coli*. *PLoS One* **2009**, 4, (9), e7002.
18. Brieba, L. G.; Eichman, B. F.; Kokoska, R. J.; Doublet, S.; Kunkel, T. A.; Ellenberger, T., Structural basis for the dual coding potential of 8-oxoguanosine by a high-fidelity DNA polymerase. *EMBO Journal* **2004**, 23, (17), 3452-3461.
19. Liu, S.; Knafels, J. D.; Chang, J. S.; Waszak, G. A.; Baldwin, E. T.; Deibel, M. R.; Thomsen, D. R.; Homa, F. L.; Wells, P. A.; Tory, M. C., Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281, (26), 18193.
20. Franklin, M. C.; Wang, J.; Steitz, T. A., Structure of the replicating complex of a pol [alpha] family DNA polymerase. *Cell* **2001**, 105, (5), 657-667.
21. DeLano, W. L. *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific: San Carlos, CA, USA, 2002.
22. Wu, Y.; Li, L.; Yang, L. S.; Weng, S. P.; Chan, S. M.; He, J. G., Inhibition of white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* shrimp by sequence-specific siRNA. *Aquaculture* **2007**, 271, (1-4), 21-30.
23. Tzeng, H. F.; Chang, Z. F.; Peng, S. E.; Wang, C. H.; Lin, J. Y.; Kou, G. H.; Lo, C. F., Chimeric polypeptide of thymidine kinase and thymidylate kinase of shrimp white spot syndrome virus: thymidine kinase activity of the recombinant protein expressed in a baculovirus/insect cell system. *Virology* **2002**, 299, (2), 248-255.

© 2010 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

ANEXO II

Enrique de-la-Re-Vega, Adriana T. Muhlia-Almazan, Aldo A. Arvizu-Flores, Maria A. Islas-Osuna, Gloria Yepiz-Plascencia, Luis G. Briebe, Rogerio R. Sotelo-Mundo (2011) Molecular Modeling and Expression of the *Litopenaeus vanammei* Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) after White Spot Syndrome Virus Shrimp Infection. En revision en la revista "Fish and Shellfish Immunology". Manuscript Number: FSIM-D-11-00246.

Elsevier Editorial System(tm) for Fish and Shellfish Immunology Manuscript Draft



Short Communication

Molecular modeling and expression of the *Litopenaeus vannamei* proliferating cell nuclear antigen (PCNA) after white spot syndrome virus shrimp infection

Enrique de-la-Re-Vega^a, Adriana Muhlia-Almazan^a, Aldo A. Arvizu-Flores^b, Maria A. Islas-Osuna^a, Gloria Yepiz-Plascencia^a, Luis G. Brieba^{c,d,*}, Rogerio R. Sotelo-Mundo^{a,**}

^a Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Aquatic Molecular Biology Lab, A.C. Carretera a La Victoria km 0.6, Apartado Postal 1735, Hermosillo, Sonora, 83000, México

^b Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N, Hermosillo, Sonora, 83000, Mexico

^c Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV Unidad Irapuato) Km 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León, Apartado Postal 629, Irapuato, Guanajuato, 36500, Mexico

^d Howard Hughes Medical Institute (HHMI), International Scholar

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2011

Received in revised form

7 July 2011

Accepted 8 July 2011

Available online 26 July 2011

Keywords:

Shrimp

PCNA

Proliferating cell nuclear antigen

DNA polymerase

White spot syndrome virus

WSSV

ABSTRACT

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is the eukaryotic sliding clamp that tethers DNA polymerase to DNA during replication. The full-length cDNA of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* PCNA (*LvPCNA*) was cloned and encoded a protein of 260 amino acids that is highly similar to other Crustacean PCNAs. The theoretical shrimp PCNA structure has all the domains that are necessary for its interaction with template DNA and DNA polymerase. RT-PCR analysis showed that *LvPCNA* is expressed mainly in muscle and hemocytes and much less in hepatopancreas and gills. *LvPCNA* mRNA levels are not statistically different in muscle from healthy and challenged shrimp with the white spot syndrome virus (WSSV). In contrast, the mRNA levels of the viral DNA polymerase show a biphasic pattern with expression at 6 h post-infection and later at 24 and 48 h. These results suggest that in shrimp muscle *LvPCNA* levels are steadily kept to allow viral replication and that WSSV DNA polymerase (*WSSV-DNApol*) is more responsive towards later stages of infection. More knowledge of the DNA replication machinery would result in a better understanding of the mechanism and components of viral replication, since the WSSV genome does not have all the components required for assembly of a fully functional replisome.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is the sliding clamp involved in the replication of DNA as part of the well-studied "replisome" [1]. PCNA was first identified as an auxiliary protein for the mammalian DNA polymerase δ [2,3]. It is known that PCNA also plays an important role in cell-cycle regulation and check point control [1,4], DNA repair [5], translesion DNA synthesis, DNA methylation, chromatin remodeling, and it is reported to be necessary for the replication of the Simian Virus 40 (SV40) genome [6,7]. PCNA is comprised of three monomers that form a ring-shaped protein trimer in a head-to-tail arrangement. This assembly encircles the DNA in cooperation with replication factor C (RF-C) and other proteins. The interaction

between PCNA and DNA polymerase allows the latter to continue bound to DNA and this increases processivity during DNA synthesis [1,8]. PCNA can also interact with other proteins as p21, Gadd45 and CDK2 involved in different mechanisms like DNA repair, cell-cycle control and chromatin remodeling [4,6,8,9].

Genes encoding PCNA and its homologs have been isolated from a wide variety of animals [10–12], fungi [13,14], and marine phytoplankton [15,16]. In the fruit fly there are two PCNA genes, one used for DNA replication and the other for DNA repair [17] and recently there are some reports of crustacean PCNA [18–21]. The crustacean amino acid sequences of PCNA known to date are highly conserved, they are composed of approximately 260 residues, with an theoretical isoelectric point of 4.8 and a molecular mass around 33–39 kDa [2,8,13,22].

White spot syndrome virus (WSSV) is the most devastating virus in shrimp culture spread all over the world [23,24]. There are two WSSV complete genomes known (approx. 300 kbp) with 180 ORFs, but they do not contain any DNA polymerase processivity factors [25,26] contrary to other viruses such as the herpes simplex virus, which encodes a processivity factor UL42 that is

* Corresponding author. Tel.: +52 462 6239 663.

** Corresponding author. Tel.: +52 662 289 2400x352.

E-mail addresses: lgbrieba@ira.cinvestav.mx (L.G. Brieba), rrs@ciad.mx (R.R. Sotelo-Mundo).

important for viral replication [27]. The DNA polymerase from the WSSV (WSSV-DNApol) encoded in the ORF514 has low processivity [28], thus, we suggested that the WSSV is able to use the host replication machinery as other viruses do [29,30], as well as several other host enzymes for nucleotide metabolism. The aim of this work was to identify the PCNA cDNA sequence from the shrimp *Litopenaeus vannamei*, to build a theoretical structural model and to evaluate PCNA mRNA levels in different shrimp tissues, and to compare the mRNA levels of shrimp PCNA and WSSV-DNApol.

2. Material and methods

2.1. cDNA sequence of PCNA from *Litopenaeus vannamei*

Based on one *L. vannamei* PCNA expressed sequence tag [31] and other shrimp PCNA sequences from *Marsupenaeus japonicus* (EU431336.1) and *Fenneropenaeus chinensis* (EF051247.1), three pairs of specific primers were designed and used for a DNA walking approach involving three PCR reactions (Seegene, USA) to obtain the complete 5'-UTR from the shrimp PCNA transcript. Muscle tissue was used for RNA isolation and cDNA synthesis as described below in Section 2.3. For the first reaction, the pnaRv1 primer (5'-TTGGGGCCAAGAAGTAA-3') was used while the second reaction was done with primer pnaRv2 (5'-TGCAGATACGTGCGAACTCCC-3'); and for the third reaction the primer pnaRv3 (5'-CTGTATGTACCCCTGGTCTGTT-3') was utilized. All the reactions were carried out as the manufacturer recommended. The PCR fragments were cloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen, USA) according to manufacturer instructions. Plasmid DNA from recombinant clones was isolated by the alkaline lysis method and digested with the restriction enzyme *EcoRI* [32]. Positive clones were sequenced at the UAGC laboratory at the University of Arizona (Tucson, AZ, USA). The resulting sequences were analyzed using BLAST (N, P and X) to identify them and to find homologies among sequences, ClustalW and BoxShade were used to make the alignments [33,34].

2.2. Shrimp LvPCNA molecular modeling

The homologous modeling of the LvPCNA was done by superimposing the deduced amino acid sequence into the known crystallographic structure of the human PCNA [35] (PDB:1AXC) using MOE 2010.10 (ChemComp, Montreal, Canada). We constructed 50 initial models under the CHARMM27 force field starting from a multiple sequence alignment including the amino acid sequences of PDB 1VYJ, 2ZVV, 3GPN, 2IO4, 1RWZ, 2IJX, 1UD9, 1GE8, 3IFV and 3K4X. The coordinates of DNA template in complex with the PCNA were taken from the crystallographic structure of *Escherichia coli* PCNA (PDB: 3BEP) [36] and *Saccharomyces cerevisiae* PCNA (PDB: 3K4X) [37] and included in the building of the shrimp PCNA model. The assignment of the LvPCNA domains and figures of the resulting structure were drawn also with either MOE or PyMOL 1.0 [38].

2.3. Total RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from different tissues of healthy shrimp to evaluate PCNA differential expression. Also, total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen, USA), from the tail muscle of WSSV-infected organisms [31], and from non-infected shrimps to evaluate expression of the shrimp PCNA and WSSV-DNA polymerase following the manufacturer instructions. The RNA concentration and purity was assessed spectrophotometrically by measuring the absorbance at 260 and 280 nm in a Nanodrop

spectrophotometer. Total RNA integrity was evaluated by 1.2% agarose gel electrophoresis. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 µg of total RNA with the Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen, USA), as follows: 1 µg of total RNA as template, 2 µL of genomic DNA wipeout buffer (7 ×) and RNase-free water to a final volume of 14 µL were incubated 2 min at 42 °C, then 5 min on ice. RT-PCR was done as follows: 1 µL Quantiscript reverse transcriptase reagent, 4 µL Quantiscript RT buffer (5 ×), 1 µL RT primer mix, 14 µL RNA template (from first reaction), and incubated 15 min at 42 °C, then 3 min at 95 °C.

2.4. Expression of LvPCNA in shrimp tissues by qRT-PCR

The cDNAs synthesized as previously described, were used to evaluate relative expression of LvPCNA in different shrimp tissues including gills, hepatopancreas, muscle, and hemocytes. The specific primers used for gene expression evaluation of LvPCNA were PCNAfw1 (5'-TTCGACAAGTACCCGCTGC-3') and PCNArv1 (5'-TGCAGATACGTGCGAACTCCC-3'), to amplify a 277 bp fragment. The expression of the ribosomal L8 gene (DQ316258) was done with primers L8Fw3 (5'-TAGGCAATGCATCCCCATT-3') and L8Rv3 (5'-TCTGAAGGAAGCTTTACACG-3'). The L8 gene was used as an internal control to normalize the shrimp LvPCNA and WSSV-DNA polymerase expression levels.

2.5. Expression of LvPCNA and WSSV-DNApol in the muscle of shrimp by qRT-PCR

Adult shrimp from a WSSV infection assay ($n=15$) were sampled at 0, 6, 12, 24 and 48 h after injection with a WSSV inoculum (buffered saline extract of infected shrimp tissue) as previously described [31]. A control saline-solution injected group of healthy shrimp was also sampled at time 0. Each sample was assayed by triplicate. After 48 h post injection, WSSV infection was detected by PCR analysis in the infected shrimp, but not in the control group (data not shown). The muscle cDNA synthesized as mentioned above was used as template for real-time qPCR analysis. Besides PCNA and L8, the following WSSV-DNApol specific primers were used WSVrtfw1 (5'-AGATTGAGCACCCCTCAAGA-3') and WSVrtv1 (5'-TCTGGAAACCATCTCGTGTAT-3') to amplify a 220 bp fragment in the WSSV-infected shrimp.

All PCR reactions were done in an iQ5 multicolor real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA), and all time points post-infection were run in triplicates. Reactions were done as follows: 25 µL total volume reactions included 12.5 µL of 2X iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA), 0.7 µL (5 µM) each oligonucleotide, cDNA synthesized from 150 ng of total RNA from each individual sample and water.

PCR conditions for LvPCNA and WSSV-DNApol were: 95 °C, 5 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 30 s, 51 °C for 35 s, 72 °C for 55 s, with a final melting curve program from 60 °C to 95 °C increasing 0.3 °C each 20 s. Fluorescence readings were taken at 72 °C after each amplification cycle. For L8 the PCR conditions were the same but with an annealing temperature of 60 °C.

To calculate the expression of shrimp LvPCNA gene in different tissues, the $2^{-\Delta C_T}$ method was used [39], where $-\Delta C_T = -(C_T\text{PCNA} - C_T\text{L8})$ for each tissue studied. To calculate changes in the expression of both genes, shrimp LvPCNA and WSSV-DNApol during shrimp WSSV infection, the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method was used [40]. Calculations were based on the C_T value of each sample during PCR amplification, where $-\Delta\Delta C_T = -((C_T\text{target} - C_T\text{L8}) - (C_{T\text{Avg target}} - C_{T\text{Avg L8}}))$, and Avg corresponded to the averaged C_T s. Results are expressed as relative mRNA steady-state levels of the target gene and normalized to the L8 ribosomal protein. Data were analyzed by one-way ANOVA and for *post hoc* analysis the Tukey test was used. Statistical significance

was considered when $p < 0.05$, and analyses were done with NCSS software.

3. Results and discussion

3.1. cDNA and deduced amino acid sequence of shrimp PCNA

The complete sequence of the LvPCNA cDNA (GenBank JN034913) is 1103 base pairs (bp) long with a 111 bp 5'-untranslated region (5'-UTR) and a 783 bp ORF that includes the initial methionine and the stop codon. The 3'-UTR contains a canonical polyA+ tail and the polyadenylation signal, both necessary for mRNA stability (Fig. 1). The 783 bp open reading frame (ORF)

codes for a protein with 260 amino acid residues and a theoretical pI of 4.59 and a molecular weight of 28.81 kDa, very similar to PCNA from other decapods such as the shrimp *F. chinensis* and *M. japonicus* [19,20] and the Chinese mitten crab *Eriocheirjaponica sinensis* [18] (Fig. 2).

Multiple amino acid sequences alignment with other species showed that the LvPCNA is extremely conserved among invertebrates and vertebrates, and the few residues changes cluster vertebrate and invertebrate PCNA sequences separately. For example, changes from Lys to Arg occur at positions 91 and 248, between invertebrate and vertebrate sequences (Fig. 2). Nonetheless, the inner-face of the PCNA trimer is mainly positively charged (Lys or Arg residues), and it is represented in color blue (Fig. 3, panels B and D). The conserved motifs in PCNA

```

3  ACCTTCCGAAGCGGGCACCAGCACCAGACGTGTCAACCCCCCTACGGCGTCCAGCACCC
1                                     M F E
63  CCGCCAGTTCTAGTCTCCGTCGCCGCCGACCCCCACACAGCCGCCACCATGTTTCGAA
20  A R L V Q G S L L K K V L E A I K D L L
123 GCCCGTCTCGTGCAGGGGAGCCTCCTCAAGAAGTCTGGAGGCCATCAAGGACCTGCTG
40  N E A S W D C A D S G I Q L Q A M D N S
183 AACGAGGCGTCTGGGACTGCGCCGACTCGGGATCCAACGAGGCCATGGACAACCTG
60  H V S L V S L N L R A E G F D K Y R C D
243 CACGTGTCTCGTGTCCCTCAACCTCCGCGCCGAGGGGTTTCGACAAGTACCGCTGCGAC
80  R N L I M G M N L T S M S K I L K C A A
303 AGGAACCTCATCATGGGCATGAATCTCACCAGCATGTCCAAAATCCTCAAGTGTGCGAGT
100 N D D I I T M K A Q D N A D T V T F M F
363 AACGATGACATCATACAATGAAGGCCAGGATAACGCAGACACCGTCACATTCATGTTC
120 E S P N Q E K V S D Y E M K L M N L D Q
423 GAATCGCCCAACCAGGAAAAGTCTCCGATTATGAAATGAAGTGTATGAACCTTGATCAG
140 E H L G I P E T D Y A C V I K L P S G E
483 GAACATCTTGCCATCCAGAAAAGATTATGCGTGTGTTATCAAATGCCTTCTGGGGAG
160 F A R I C R D L S Q F G E S I V I A C T
543 TTCGCACGTATCTGCAGAGATCTTAGTCAGTTGGAGAGAGCATTGTCAATGCCTGCACA
180 K E G V K F S A A G D I G T A N I K L A
603 AAGGAAGGAGTCAAATCTCTGCAGCAGGAGATATTGGTACTGCAACATCAAGCTGGCA
200 Q T S S V D K E E E A V V I E M Q E P V
663 CAGACCTCCAGTGTAGACAAAGAGGAGGAGGAGTCTGTTATTGAGATGCAGGAGCCTGTC
220 T L T F A C R Y L N M F T K A T P L S P
723 ACGCTCACCTTTGCTTGCAGATACCTGAACATGTTTCAAAAAGCAACACCCCTTTCCCA
240 Q V S L S M S P D V P L V V E Y A I G E
783 CAGGTTTCACTTTCTATGTCCTTGTATCCCTGATGTACCCCTGGTCGTTGAATATGCTATTGGTGG
260 I G H I R Y F L A P K I E D E D S *
843 ATTGGCCACATCCGTTACTTCTTGGCCCCAAGATTGAGGACGAAGACTCATAAGCTTGA
                                         Stop codon
903 AGAATAGGCCTTTTATAGGGAACAAATAAATGTACAAAAATCATTAAAAAAATACTGCTA
                                         polA signal           poliA tail
963 GATGTGAATGTGGTAAAATATAAAGGTTACTTAGCATAGCACATTTTGTAAACCGGTTAT
1023 TGTAATTTTTAAAAAGCTTTTACTCATTTTATTCCTACACTGTACTACTGAATCTGAATA
1083 TGCAATAGATACTTTTCCCAA

```

Fig. 1. Complete nucleotide and amino acid sequence for shrimp LvPCNA. The initial Met is underlined, the stop codon is denoted with an asterisk, the polyadenylation signal is underlined and bolded, while the polyadenylation tail is underlined and italicized.

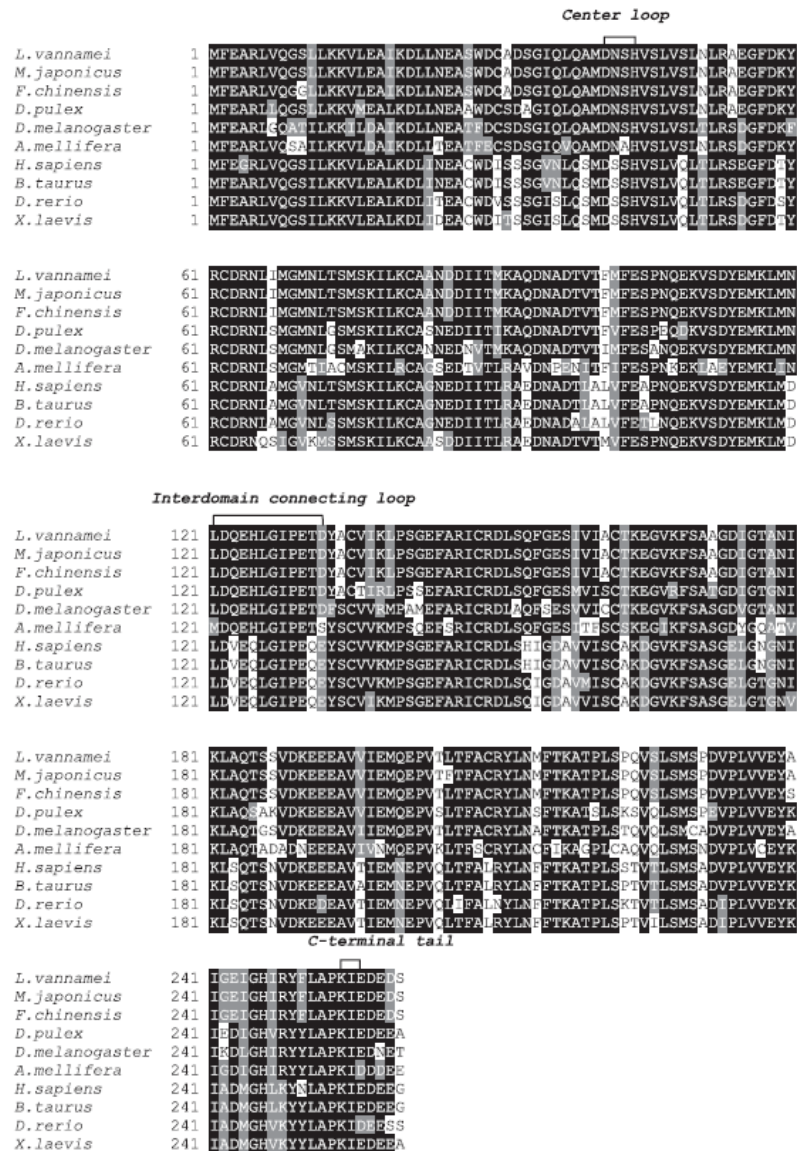


Fig. 2. Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of the *Lv*PCNA with other PCNAs. *M. japonicus* (ACA09718.1), *F. chinensis* (ABM66815.1), *D. pulex* (EFX70582.1), *D. melanogaster* (AAA28746.1), *A. mellifera* (XP_001122985.1), *H. sapiens* (CAG46598.1), *B. Taurus* (DAA23435.1), *D. rerio* (AAH49535.1), *X. laevis* (NP_001081011.1). The three important domains in the PCNA are indicated as center loop, interdomain connecting loop and the C-terminal tail, involved in the recognition of DNA and the polymerase.

(central loop, back-side loop and inter-domain connector loop) were identified in the shrimp PCNA model (Fig. 3, panel A). These domains are important for the interaction of PCNA with DNA and are totally conserved. A recent publication of the PCNA from *S. cerevisiae* reports that mutations of some of the basic residues at this inner-face reduce its affinity for DNA and other proteins needed for replication, and consequently impair processivity of DNA replication [37].

All three conserved motifs in PCNA were identified in the shrimp-deduced amino acid sequence. These motifs are important

for the interaction of the PCNA/DNA complex within the replisome, like the center loop which interacts with replication factor C (RF-C) and DNA polymerase δ , the inter-domain connecting loop which interacts with DNA polymerase δ and the C-terminal tail which interacts with replication factor C (RF-C) [6,9,41].

3.2. Molecular structure of PCNA and interaction with DNA

It is quite interesting that from yeast to vertebrate and invertebrate animals, PCNA shares the same fold and quaternary

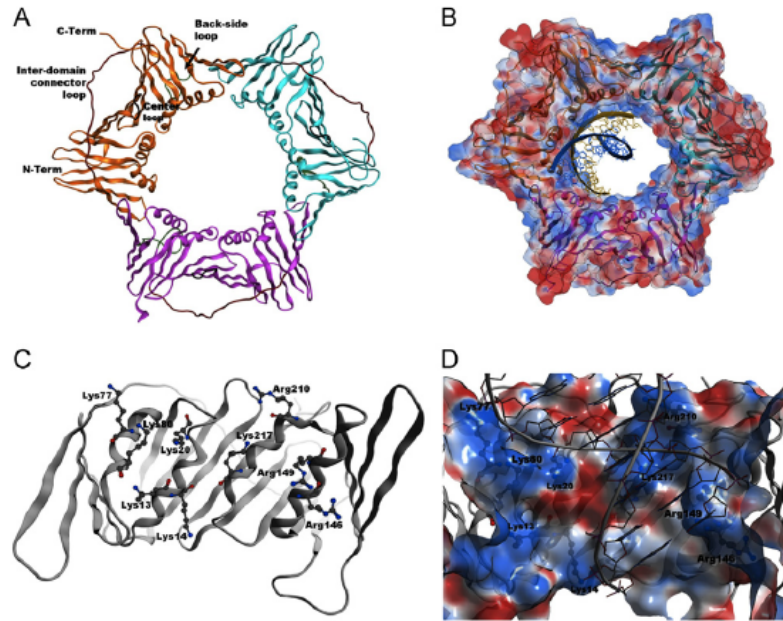


Fig. 3. *LvPCNA* Molecular modeling. (Panel A) Overall fold of the PCNA trimer (monomers are colored in orange, cyan and magenta). The functional domains are indicated. (Panel B) PCNA trimer modeled with a DNA double strand and with the electrostatic surface colored in red (negative charged) and blue (positive charged). Note that the inward face in contact with the DNA is colored blue as the side chains of Lys and Arg residues are within interaction with the positively charged DNA backbone. (Panel C) Positioning of basic residues facing the DNA. (Panel D) similar to Panel C bound to DNA. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

structure. This is, that PCNA forms a donut-shaped trimer with each polypeptide made of two functional domains each (Fig. 3, panel A). PCNA is assembled around DNA by replication factor C (RF-C) and since PCNA binds to DNA pol, it works as a processivity factor that prevents the disassembly of the replication complex. Since DNA is heavily charged with the negatively charged phosphate backbone, the interaction in the inside face of the PCNA ring is made of positively charged residues (Fig. 3, panel B). These residues (Arg and Lys) face the interior of the ring (Fig. 3, panel C) and the molecular modeling predicts that such ionic interactions are feasible (Fig. 3, panel D).

The identity between shrimp and human PCNA is 73% at the amino acid sequence, and the homology model constructed with the human template resulted in a RMSD of 0.50 Å for the backbone. The theoretical model showed the two canonical alpha-beta box domains with the β - α - β - β - β - α - β - β - β topology, connected with each other by the inter-domain connector loop. The central and C-terminal loops at the front side of the PCNA were properly modeled to form interactions with other proteins during replication (Fig. 3, panel A). The overall fold at the quaternary structure showed a central cavity formed from the twelve α -helices, which trap DNA by means of unspecific electrostatic interactions.

The central cavity in the shrimp PCNA model exposed nine basic residues (Arg and Lys) from each subunit that in other PCNAs contact the DNA molecule during replication. These residues include the Lys13, Lys14, Lys20, Lys77 and Lys80 from the N-terminal domain and Arg146, Arg149, Arg210 and Lys217 from the C-terminal domain. All these residues were located at the α -helix secondary structure components of the PCNA (Fig. 3, panels C and D) as seen in other PCNAs in complex with DNA.

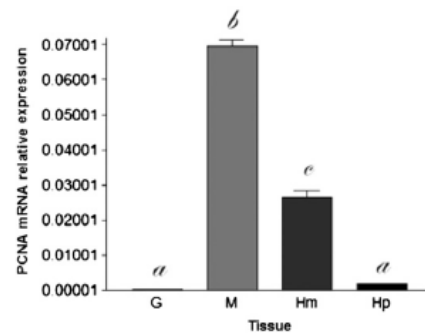


Fig. 4. Relative expression of *LvPCNA* in different tissues. Different *italic* letters show statistical difference ($p < 0.05$) between tissues. G: gills, M: muscle, Hm: hemocytes, Hp: hepatopancreas.

3.3. Expression of shrimp *LvPCNA* and *WSSV-DNApol* in different tissues and during *WSSV* muscle infection

Expression of PCNA was first analyzed in different tissues as hepatopancreas, muscle, gills and hemocytes. We found that *LvPCNA* is expressed in all tissues analyzed, but the amounts varied among them (Fig. 4). The *LvPCNA* is expressed in muscle > hemocytes > hepatopancreas > gills. The muscle PCNA mRNA levels were 200-fold higher than those expressed in gills, these results are comparable with those reported for *F. chinensis*, where expression of PCNA mRNA was higher in muscle than hepatopancreas and hemocytes [20]. Since shrimp muscle accumulates

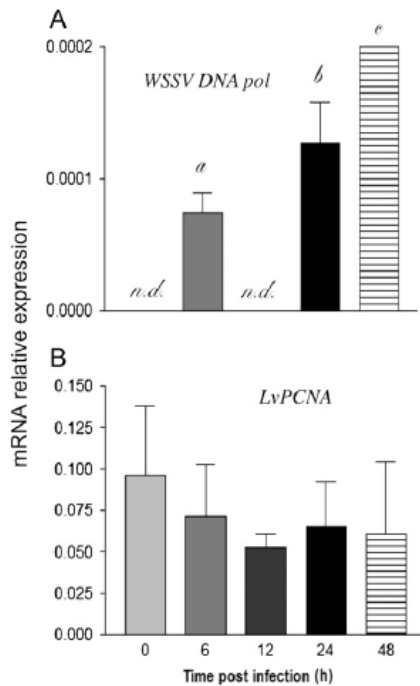


Fig. 5. Relative expression in shrimp muscle infected with WSSV. (Panel A) Difference ($p < 0.05$) between hours p.s.i. (Panel B) Difference between hours p.s.i. Data normalized with L8 constitutive gene. Italics represent statistically different values, n.d. stands for non-detectable.

larger amounts of PCNA mRNAs, this tissue was selected to evaluate if both genes, *LvPCNA* and *WSSV-DNApol* are expressed at similar levels in virus-infected shrimp. The WSSV-DNA polymerase was expressed at 6 h post-infection. This early expression of *WSSV-DNApol* agrees with the data reported by Chen et al. [42], that found that the viral DNA polymerase is expressed as early as 2 h post-infection; however, these authors did not detect changes in expression through the WSSV infection. At 6 h post-infection, *WSSV-DNApol* mRNA levels increased, but after 12 h, the transcript was not detectable. These results also suggest that although the *WSSV-DNApol* mRNA is degraded, the DNA polymerase protein is more stable. Later, the virus goes on expressing middle and late genes to produce the proteins to form the virions and then proceed to assemble the whole infecting virus [25]. Interestingly, the *WSSV-DNApol* levels were up again after 24 and 48 h post-infection (Fig. 5a). In this study, *LvPCNA* was expressed at all the times sampled during the viral infection (Fig. 5b). Thus, it is possible that viral DNA replication is carried out by the protein translated at early stages until it is completed (Fig. 5).

4. Conclusions

The conservation of replication proteins reflects the importance of each residue for its function within the replisome. The sequence and structure of PCNA appears to be well conserved and consistent with the role of PCNA in DNA replication. Future studies should be aimed at validating the role of PCNA into WSSV viral replication, either from RNAi silencing studies or by

biochemical assays where replication is tested in vitro and addition of recombinant PCNA increases the processivity of WSSV DNA pol.

Acknowledgments

CONACYT (Mexico's National Research Council for Science and Technology) is acknowledged for a doctoral scholarship to E. de-la-Re-Vega and for a Grant CB-2009-01-131859 to R. Sotelo-Mundo.

References

- [1] Johnson A, O'Donnell M. Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Biochemistry* 2005;74:283.
- [2] Bravo R, Frank R, Blundell PA, MacDonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase. *Nature* 1987;326:515–7.
- [3] Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-auxiliary protein. *Nature* 1987;326:517–20.
- [4] Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 1997;14:629.
- [5] Masih PJ, Kunnev D, Melendy T. Mismatch repair proteins are recruited to replicating DNA through interaction with proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Nucleic Acids Res* 2008;36:67.
- [6] Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 2003;116:3051.
- [7] Tsurimoto T, Stillman B. Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins. *J Biol Chem* 1991;266:1950.
- [8] Fukuda K, Morioka H, Imajou S, Ikeda S, Ohtsuka E, Tsurimoto T. Structure-function relationship of the eukaryotic DNA replication factor, proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 1995;270:22527.
- [9] Tsurimoto T. PCNA, a multifunctional ring on DNA. *Biochim Biophys Acta* 1998;1443:23.
- [10] Almendral JM, Huebsch D, Blundell PA, Macdonald-Bravo H, Bravo R. Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: homology with DNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1575.
- [11] Yamaguchi M, Hayashi Y, Hirose F, Matsuoka S, Moriuchi T, Shiroishi T, et al. Molecular cloning and structural analysis of mouse gene and pseudogenes for proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Res* 1991;19:2403.
- [12] Matsumoto K, Moriuchi T, Koji T, Nakane PK. Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *EMBO J* 1987;6:637.
- [13] Hamada F, Namekawa S, Kasai N, Nara T, Kimura S, Sugawara F, et al. Proliferating cell nuclear antigen from a basidiomycete, *Coprinus cinereus*. *Eur J Biochem* 2002;269:164–74.
- [14] Bauer GA, Burgers MJ. Molecular cloning, structure and expression of the yeast proliferating cell nuclear antigen gene. *Nucleic Acids Res* 1990;18:261.
- [15] Huang J, Liang S, Sui Z, Mao Y, Guo H. Cloning and characterization of proliferating cell nuclear antigen gene of *Alexandrium catenella* (dinoflagellate) with respect to cell growth. *Acta Oceanol Sinica* 2010;29:90–6.
- [16] Lin S, Carpenter EJ. Identification and preliminary characterization of PCNA gene in the marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta* and *Isochrysis galbana*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1998;7:62–71.
- [17] Ruike T, Takeuchi R, Takata K, Oshige M, Kasai N, Shimanouchi K, et al. Characterization of a second proliferating cell nuclear antigen (PCNA2) from *Drosophila melanogaster*. *FEBS J* 2006;273:5062–73.
- [18] Li P, Zha J, Kong Y, Chen C, Sun H, Song D, et al. Identification, mRNA expression and characterization of proliferating cell nuclear antigen gene from Chinese mitten crab *Eriocheir japonica sinensis*. *Comp Biochem Physiol A Biochem Mol Biol* 2010;157(2):170–6.
- [19] Zhang Z, Shen B, Wang Y, Chen Y, Wang G, Lin P, et al. Molecular cloning of proliferating cell nuclear antigen and its differential expression analysis in the developing ovary and testis of penaeid shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *DNA Cell Biol* 2010;29:163–70.
- [20] Xie Y, Wang B, Li F, Jiang H, Xiang J. Molecular cloning and characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008;151:225–9.
- [21] Wu C, Söderhäll I, Kim YA, Liu H, Söderhäll K. Hemocyte-lineage marker proteins in a crustacean, the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Proteomics* 2008;8:4226–35.
- [22] Liu J, Jiao N, Hong H, Luo T, Cai H. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a marker of cell proliferation in the marine dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* lu and the green alga *Dunaliella salina* teodoresco. *J Appl Phycol* 2005;17:323–30.
- [23] Bustillo MI, Escobedo-Bonilla CM, Sotelo-Mundo RR. A review of pathogenesis and molecular strategies against white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Rev Biol Mar Oceanogr* 2009;44(1):1–11.
- [24] Sánchez-Paz A. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet Res* 2010;41:43.

- [25] van Hulten MCW, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N, Turchini R, Fiers M, et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 2001;286:7–22.
- [26] Yang F, He J, Lin X, Li Q, Pan D, Zhang X, et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol* 2001;75(23):11811–20.
- [27] Zuccola HJ, Filman DJ, Coen DM, Hogle JM. The crystal structure of an unusual processivity factor, herpes simplex virus UL42, bound to the c terminus of its cognate polymerase. *Mol Cell* 2000;5:267–78.
- [28] de-la-Re-Vega E, Garcia-Orozco KD, Arvizu-Flores AA, Yepiz-Plascencia G, Muhlia-Almazan A, Hernández J, et al. White spot syndrome virus ORF514 encodes a *bona fide* DNA polymerase. *Molecules* 2010;16:532–42.
- [29] Berkhout B, Haasnoot J. The interplay between virus infection and the cellular RNA interference machinery. *FEBS Lett* 2006;580:2896–902.
- [30] Caspar DLD, Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1962. (p. 1).
- [31] Clavero-Salas A, Sotelo-Mundo RR, Gollas-Galvan T, Hernandez-Lopez J, Peregrino-Uriarte AB, Muhlia-Almazan A, et al. Transcriptome analysis of gills from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol* 2007;23:459–72.
- [32] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- [33] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389.
- [34] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The clustal_x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876.
- [35] Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M, Kuriyan J. Structure of the C-terminal region of p21WAF1/cip1 complexed with human PCNA. *Cell* 1996;87:297–306.
- [36] Georgescu RE, Kim SS, Yurieva O, Kuriyan J, Kong XP, O'Donnell M. Structure of a sliding clamp on DNA. *Cell* 2008;132:43–54.
- [37] McNally R, Bowman GD, Goedken ER, O'Donnell M, Kuriyan J. Analysis of the role of PCNA–DNA contacts during clamp loading. *BMC Struct Biol* 2010;10:3.
- [38] DeLano WL. The PyMol molecular graphics system. 2002.
- [39] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_t method. *Nat Protocols* 2008;3:1101–8.
- [40] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2- $[\Delta\Delta C_t]$ method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [41] Vijayakumar S, Chapados BR, Schmidt KH, Kolodner RD, Tainer JA, Tomkinson AE. The c-terminal domain of yeast PCNA is required for physical and functional interactions with cdc9 DNA ligase. *Nucleic Acids Res* 2007;35:1624.
- [42] Chen LL, Wang HC, Huang CJ, Peng SE, Chen YG, Lin SJ, et al. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. *Virology* 2002;301:136–47.