

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Participación de la proteína de choque térmico 90 en la  
infección por el calicivirus felino.”

## **TESIS**

Que presenta

**Biól. Martin Luis Ortiz Palafox**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

**En**

**Infectómica y Patogénesis Molecular**

Directora de la Tesis:

**Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano**

México, D.F.

Diciembre, 2015

## **Agradecimientos**

A mi padres Selene y Andrés, a mis abuelas Yeli y Yola, y a mi primo Omar; a todos ellos por el apoyo que me han proporcionado.

A mi tutora, la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano por permitirme trabajar en su laboratorio bajo su dirección durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Rosa María del Angel Núñez de Cáceres y al Dr. Juan Ernesto Ludert León por la asesoría en este trabajo.

A la Dra. Clotilde Cancio Lonches por la asistencia en el cultivo celular y José Luis Chavarría Islas por la asistencia en el laboratorio y a todos los integrantes del laboratorio 9 de virología y compañeros de generación.

AGRADECIMIENTO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA  
(CONACYT) POR SU APOYO Y PATROCINIO PARA LA REALIZACIÓN DE  
ESTE PROYECTO DE TESIS

## Índice

Resumen.....	v
Abstract .....	vi
1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	2
2.1 Enfermedad y control del Calicivirus felino .....	2
2.2 Estructura del virión y organización del genoma .....	3
2.3 Organización genómica.....	3
2.4 Ciclo replicativo de Calicivirus felino .....	5
2.4.1 Unión y entrada.....	5
2.4.2 Síntesis de proteínas y del RNA viral.....	6
2.4.3 Salida viral .....	7
2.5 Chaperona Molecular HSP90.....	8
2.5.1 Características y estructura.....	8
2.5.2 Ciclo de chaperona de la Hsp90 .....	10
2.5.3 Proteínas cliente de Hsp90.....	11
2.6 Hsp90 y su implicación en la replicación viral .....	13
2.6.1 Paramyxoviruses y rhabdoviruses.....	14
2.6.2 Flavivirus.....	14
2.6.3 Picornavirus.....	15
2.6.4 Calicivirus.....	15
3. Justificación.....	17
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivos .....	19
5.1 Objetivo general .....	19
5.2 Objetivos particulares.....	19
6. Metodología .....	20
6.1 Cultivo celular y virus .....	20
6.2 Ensayos en placa .....	20
6.3 Tratamiento de células infectadas con geldanamicina .....	20
6.4 Ensayos de viabilidad celular.....	21

6.5 Extractos proteicos .....	21
6.6 Análisis de proteínas por western blot .....	22
6.7 Inmunofluorescencias.....	22
6.8 Anticuerpos para inmunofluorescencia y western blot .....	22
7. Resultados .....	24
7.1 Patrones de expresión de Hsp90 durante la infección por FCV .....	24
7.2 Efecto citotóxico de la geldanamicina e inhibición de la HSP90.....	25
7.3 Efecto de la inhibición de la Hsp90 por el tratamiento de geldanamicina en la infección por FCV.....	29
7.4 Posible papel de la HSP90 en la replicación de FCV.....	31
8. Discusión.....	36
9. Conclusión.....	39
10. Perspectivas.....	39
11. Referencias.....	40

## **Resumen**

Los calicivirus humanos (HuCV) son los principales agentes de brotes de gastroenteritis no bacteriana en el mundo, y también causan un gran número de casos esporádicos. A pesar de su impacto en la salud pública, los calicivirus han sido pobremente caracterizados debido a la carencia de un sistema de cultivo exitoso para su propagación. Sin embargo, el calicivirus felino (FCV) ha sido uno de los mejores modelos para estudiar las estrategias de replicación de este grupo de virus.

Como cualquier otro virus, los calicivirus utilizan la maquinaria celular para poder llevar a cabo su ciclo replicativo de manera exitosa, y la interacción entre los componentes celulares y virales ocurre desde la entrada hasta la salida viral.

En nuestro laboratorio, estamos interesados en estudiar el papel de proteínas celulares en la replicación de estos virus. En este trabajo estudiamos el papel de la chaperona molecular Hsp90 (del inglés Heat shock protein) y encontramos que aunque ésta no es modulada durante la infección por el FCV, la inhibición de su actividad de chaperona retrasó el efecto citopático y comprometió la producción de la progenie viral por más de 3 órdenes de magnitud, sugiriendo que esta chaperona molecular es esencial para la producción eficiente del FCV.

Dada la complejidad estructural y el papel multifuncional de algunas proteínas virales, no es de sorprender que muchas de éstas, sean dependientes de la maquinaria de chaperonas para que su estabilidad, plegamiento y funcionamiento sean adecuados. Al evaluar el efecto de la inactivación de Hsp90 en la producción de las proteínas virales encontramos que la proteína no estructural NS3 reduce su expresión a tiempos tempranos de la infección, mientras que la presencia de la proteína estructural mayoritaria de la cápside o VP1 se ve severamente afectada.

Mediante ensayos de inmunofluorescencia encontramos que la proteína VP1 y la Hsp90 co-localizan, por lo que sugerimos que la estabilidad de VP1 es altamente dependiente de la actividad de la chaperona molecular Hsp90.

## **Abstract**

Human caliciviruses (HuCV) are the main agents of non bacterial gastroenteritis outbreaks and sporadic cases in the world. Despite its impact on public health, they have been poorly characterized due to the lack of successful cultivation system for propagation. However, feline calicivirus (FCV) has been one of the best models to study the replication strategies of this group of viruses.

Like any other virus, calicivirus use the cellular machinery to carry out its replicative cycle successfully, and the interaction between viral and cellular components occurs from the entry until the viral shedding. In our lab, we are interested in studying the role of cellular proteins in the replication of these viruses. We studied the role of the molecular chaperone Hsp90 (Heat shock protein) and found that, although this protein is not modulated during FCV infection, the inhibition of its chaperone activity delayed the cytopathic effect and committed the viral progeny over 3 orders of magnitude, suggesting that this molecular chaperone is essential for the efficient production of FCV.

Given the structural and functional complexity of many viral proteins, it is not surprising that they are dependent on chaperones for their folding and function. By evaluating the effect of inactivation of Hsp90 in the production of viral proteins, we found that the nonstructural protein NS3 reduces its expression at early stages of infection, while the presence of the major capsid protein VP1 is severely affected.

By immunofluorescence assays we found that VP1 and Hsp90 co-located, so we suggest that the stability of VP1 is highly dependent on the molecular chaperone Hsp90.

## 1. Introducción

La familia *Caliviviridae* está compuesta de virus con genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva, que se clasifican en 5 generos: *Sapovirus*, *Nebovirus*, *Lagovirus*, *Norovirus* y *Vesivirus* (1, 2). Estos virus, infectan a una gran variedad de vertebrados y causan enfermedades muy diversas. Los calicivirus entéricos humanos (HuCVs), clasificados en los géneros *Norovirus* (NoVs) y *Sapovirus* (SaVs), son de importancia en la salud pública, ya que son uno de los principales agentes etiológicos causantes de gastroenteritis no bacteriana en humanos (3).

Los HuCVs, producen síntomas que por lo general duran entre 1 y 3 días, e incluyen vómito, náuseas, diarrea, calambres abdominales, e inclusive se puede presentar fiebre de bajo grado. Las infecciones por NoVs son muy comunes en grupos de todas las edades y se estima que son responsables del 80 % de brotes de gastroenteritis aguda no bacteriana así como también de casos esporádicos (3, 4). El principal modo de transmisión es por consumo de alimentos contaminados, y la propagación y el establecimiento de los brotes se debe al contacto entre personas y al contacto con partículas virales presentes en superficies contaminadas.

A pesar del impacto significativo que tienen en la salud pública, tanto los SaVs como los NoVs que infectan a humanos han sido caracterizados pobremente, en gran parte debido al hecho de que aún no se han podido propagar en líneas celulares o modelos animales accesibles. A diferencia de los HuCVs, el calicivirus felino (FCV), el calicivirus entérico porcino (PEC) y el norovirus murino (MNV) si pueden ser propagados exitosamente en cultivo celular, y como tales, son usados como buenos sistemas modelo para estudiar su biología. El FCV es particularmente un buen modelo de estudio, dado a que: 1) se propaga en cultivos celulares de fibroblastos, los cuales son muy adecuados para la manipulación genética, 2) a que se replica en tiempos cortos y 3) a la disponibilidad de los sistemas de genética reversa (5), por lo que ha sido usado en las dos décadas pasadas como un sustituto ideal para investigar las estrategias generales de replicación de los calicivirus.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Enfermedad y control del Calicivirus felino**

El FCV es hasta la fecha el miembro mejor estudiado del género *Vesivirus* y es considerado como el prototipo del género. Este virus infecta a gatos a través de la vía oral, nasal y oftálmica y se replica predominantemente en tejidos orales y respiratorios (6). Patológicamente, la infección está asociada a un rango amplio de síntomas clínicos que van desde una infección no aparente hasta síntomas orales leves y del tracto respiratorio superior. A menudo se presenta ulceración oral, conjuntivitis, desordenes respiratorios acompañados por secreción nasal y ocular. Muy rara vez produce síntomas más severos que puedan causar la muerte del huésped. Otros síntomas que se pueden presentar son artritis acompañada de cojera e ictericia

El FCV se encuentra diseminado en las poblaciones de gatos (7) y las posibilidades de que un gato se infecte en una determinada población correlaciona con la frecuencia de contactos con diferentes individuos, por lo que la frecuencia de animales positivos a anticuerpos incrementa con el tamaño del grupo y usualmente varía entre el 10% y 40%, aunque en algunos casos, se ha reportado una prevalencia mayor al 90% (7, 8). Generalmente se acepta que no hay reservorios de FCV en hospederos alternativos, de tal manera que el virus se mantiene en la población de felinos mediante la propagación de virus provenientes de gatos infectados de forma aguda o por portadores. La mayoría de los gatos infectados arrojan partículas de FCV a través de secreciones orofaríngeas durante aproximadamente 30 días y después de este periodo el virus es eliminado del organismo. Estos animales por lo tanto son considerados como una fuente constante de producción de virus y probablemente son responsables de mantener el virus circulando en la población. Los virus secretados son muy estables y pueden persistir en el medio ambiente por días e inclusive semanas, (9, 10)

La vacunación es la mejor medida razonable para la prevención y el control de la infección producida por FCV. Existen vacunas que constan de virus atenuados o antígenos virales inactivados y son consideradas seguras y efectivas. Sin embargo, estas vacunas no previenen la infección productiva y el establecimiento de un estado portador, condición que también puede ocurrir en animales vacunados (11).



## **2.2 Estructura del virión y organización del genoma**

Los viriones de la familia *Caliciviridae*, incluyendo el FCV, presentan una morfología característica, con depresiones en forma de copa, la cual hace alusión al nombre de la familia (del latín "calix", copa) (1). Los viriones no poseen envoltura o membrana lipídica y tienen un tamaño de 30 a 50 nm de diámetro. La cápside se encuentra formada por 180 copias de la proteína mayoritaria de la cápside o VP1 y de 1 a 10 copias de la proteína minoritaria de la cápside o VP2, las cuales en conjunto forman una cápside que envuelve al genoma. VP1 consta de 2 diferentes dominios llamados S y P (del inglés Shell y Protruding, respectivamente). El dominio S compone la estructura más interna de la cápside mientras que el dominio P constituye la parte más sobresaliente de la misma. El dominio P a su vez puede dividirse en P1 y P2 con P2 dentro de P1. El dominio P2 posee dos regiones con una alta tasa de variabilidad las cuales están altamente relacionadas con la unión al receptor (12). La proteína VP2 en un principio se pensó que no era necesaria para el ensamble del virión o al menos para la formación de partículas parecidas a virus o VLPs del norovirus Hawaii (13), el calicivirus entérico porcino (14) y como ya se mencionó anteriormente para el FCV (15), sin embargo, posteriormente se observó que las depresiones que dan forma de copa a la partícula viral se generaban en la VLPs cuando VP2 está presente, generándose cápsides similares a las nativas en cuanto a forma y apariencia, sugiriendo que VP2 es una proteína importante en el ensamble de la cápside viral (16).

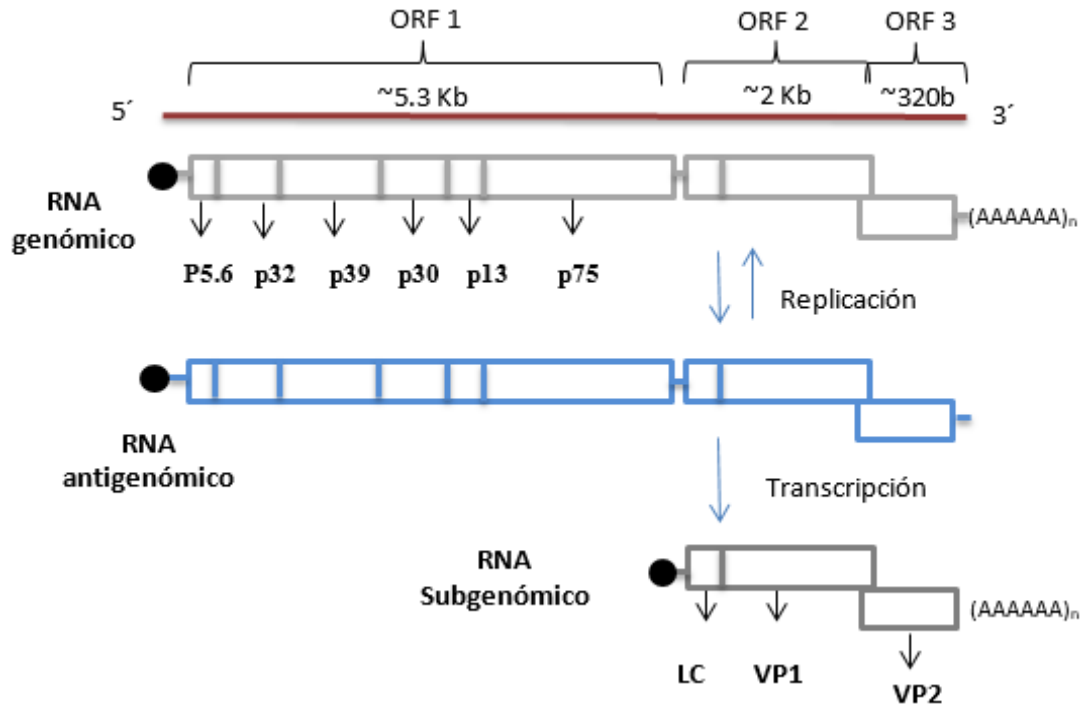
La proteína VP1 tiene la capacidad de auto ensamblarse aun en ausencia de otras proteínas virales y producir VLPs, por lo que estas pueden utilizarse para la producción de anticuerpos y como sustratos de reconocimiento de sueros inmunes.

## **2.3 Organización genómica**

El FCV posee un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva con una longitud de aproximadamente 7.5Kb, que se encuentra flanqueado por dos regiones no traducidas (RNT); la RNT 5', localizada en el extremo 5' terminal, es muy

pequeña y puede variar entre 2 y 25 nt, mientras que la RNT3' terminal, es hasta de 70 nt y esta seguida de un tracto poliadenilado. Ambas regiones terminales contienen elementos importantes para la regulación de la replicación viral. El extremo 5' del genoma posee una proteína unida covalentemente denominada VPg y en el extremo 3' terminal se encuentra la proteína de unión al tracto poliadenilado o PABP. El genoma de FCV tiene 3 marcos de lectura abiertos u ORFs (del inglés Open Reading Frame). El primer ORF abarca aproximadamente 5290 nucleótidos y da origen a una poliproteína con un peso molecular de 200 kDa, que es procesada por la proteasa viral y da origen a las 6 proteínas no estructurales. El segundo ORF tiene una longitud de alrededor de 2000 nucleótidos y codifica para un polipéptido precursor de VP1 de 74 kDa que posteriormente es procesado para dar origen a la proteína VP1 madura de 60 kDa y a un péptido conocido como líder de la cápside (LC) de 14 kDa, que se ha asociado con la patogenicidad del virus (17, 18). La proteína VP2 es una proteína de 12.2 kDa que está codificada por el tercer ORF, el cual tiene una longitud de alrededor de 320 nucleótidos.

El primer ORF se traduce a partir del RNA genómico (RNAg), mientras que el segundo y tercero son traducidos a partir de un RNA subgenómico (RNAsg) de 2.5 kDa que corresponde a los ORF 2 y 3 codificados en el RNAg (Fig.1).



**Figura 1.** Representación esquemática del genoma del FCV. Esquema del RNA genómico del FCV, resaltando la organización del primer ORF que da origen a las proteínas no estructurales. El RNA genómico es un molde para generar al RNA intermediario de cadena negativa (azul), el cual a su vez se toma como plantilla para replicar al RNA genómico que formará al genoma de la progenie viral y para transcribir al subgenómico, que contiene el ORF 2 y 3, y es traducido para generar a las proteínas estructurales VP1 y VP2, respectivamente. El círculo negro representa a la proteína viral VPg que se encuentra unida al extremo 5', mientras que en el extremo 3' se esquematiza el tracto poliadenilado.

## 2.4 Ciclo replicativo de Calicivirus felino

### 2.4.1 Unión y entrada

Hasta la fecha no se conoce en su totalidad al complejo proteico celular que el virus necesita para acoplarse a su célula huésped, sin embargo, la molécula de adhesión JAM-1, una glicoproteína de superficie celular, actúa como molécula receptora para la unión de este virus a las células, aunque no participa en la entrada del virión. El ácido siálico ha sido propuesto como un componente adicional de receptor, ya que enzimas que degradan el ácido siálico reducen la infección considerablemente, además, el tratamiento con tunicamicina, un inhibidor de N-glicosilación, reduce la

unión del FCV a células CRFK, no así el tratamiento con PDMP, un inhibidor de la síntesis de glicolípidos (19)

Posterior a la interacción del FCV con la superficie de célula huésped, se lleva a cabo la internalización de la partícula viral, a través de endocitosis mediada por clatrina y se requiere de la acidificación de endosomas (20), para provocar la liberación del RNA genómico.

#### **2.4.2 Síntesis de proteínas y del RNA viral**

El RNA genómico del FCV, al ser de polaridad positiva, una vez que se encuentra en el citosol, puede traducirse inmediatamente, produciendo a las proteínas NS1 (p5.6), NS2 (p32) con función hasta ahora poco conocida, NS3 (p39), NS4 (p30), NS5, p13 o VPg, y la NS6-NS7(p75) o proteasa polimerasa viral, la cual se mantiene durante todo el ciclo replicativo como un heterodímero con ambas funciones (21).

La proteína VPg, que se encuentra unida covalentemente al extremo 5' terminal del genoma del FCV y de todos los miembros de esta familia de virus, es esencial para llevar a cabo la síntesis de proteínas virales (22). Particularmente, la proteína VPg del FCV, actúa como un cap proteínico y se une con varios factores del inicio de traducción canónica para promover la síntesis de las proteínas virales. VPg se une con el factor del inicio de la traducción eucariote (eIF) 4E (23, 24), con el eIF3 y eIF2 (24). La participación de eIF4G se determinó mediante la adición del factor de unión 4E-BP1 a lisados de reticulocitos de conejo, el cual inhibe la síntesis de proteínas virales probablemente debido al desplazamiento eIF4E.

Por otro lado, la infección con el FCV inhibe la síntesis de proteínas celulares a partir de las 5 horas post infección (hpi), tiempo en el cual aumenta significativamente la síntesis de proteínas virales. Se ha propuesto que la inhibición de la síntesis de proteínas es consecuencia del corte proteolítico de eIF4G (25), y de la proteína de unión al tracto poliadenilado (PABP) por la única proteasa viral NS6 y en su caso NS6/7 (26). A pesar de que eIF4G es cortado no se interfiere la interacción entre éste y eIF4E. Esto sugiere que eIF4E, eIF3, eIF4G y eIF2 son necesarios para la

traducción viral. Cabe resaltar que no se sabe cómo es que la traducción viral se lleva a cabo cuando PABP está siendo escindida. Se esperaría que PABP fuera importante para la traducción viral debido a que los RNAg y sg poseen tracto poliadenilado y se ha propuesto un mecanismo semejante a lo que ocurre con los picornavirus, en el cual el corte de PABP no afecta la interacción con eIF4G, sino que desestabiliza otros factores traduccionales que probablemente no son importantes para la síntesis de proteínas virales. Sin embargo, la importancia de PABP en la traducción viral aún no está totalmente caracterizada.

Las proteínas NS2, NS3, NS4, NS5 o VPg, y la NS6/7 se localizan en re arreglos de la membrana del retículo endoplásmico, denominados complejos de replicación, o fábricas virales. Estas estructuras son enzimáticamente activas y en ellas se lleva a cabo la síntesis del RNAg y sg (27). La proteína VPg también puede unirse a la cola de poli A del RNA genómico y actuar como un cebador para la síntesis de los RNAs de cadena negativa y positiva. Posterior a la síntesis de los RNAs g y sg, este último es traducido, y genera un polipéptido precursor de la proteína VP1 que es posteriormente procesado para dar origen a la proteína VP1 madura y a la proteína LC. Las proteínas VP1 y VP2 también están presentes en los complejos de replicación y son capaces de ensamblarse en conjunto con el RNA genómico para formar las partículas virales maduras.

### **2.4.3 Salida viral**

La liberación de las partículas virales de la célula, ocurre por lisis celular, sin embargo durante la infección se induce la apoptosis celular y se ha propuesto que la consecuente activación de caspasas participa en la liberación de las partículas virales y su diseminación en el huésped.

Para que el ciclo replicativo del FCV se lleve a cabo de una manera eficiente, es necesaria la participación de las proteínas del huésped, quienes participan activamente en cada proceso.

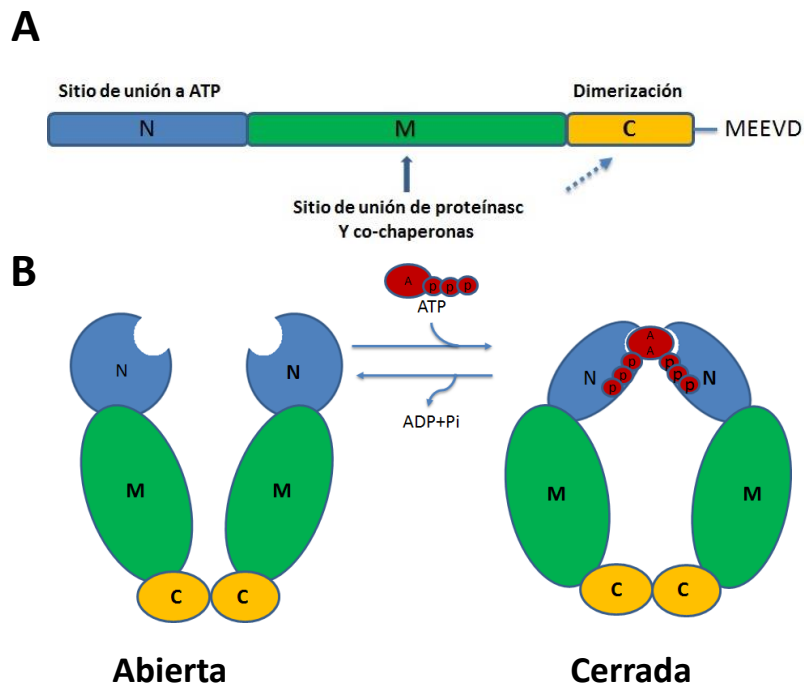
## 2.5 Chaperona Molecular HSP90

### 2.5.1 Características y estructura

La proteína de choque térmico 90 es una chaperona molecular muy conservada evolutivamente presente desde bacterias hasta mamíferos. Esta chaperona participa en varios procesos moleculares; principalmente en el plegamiento, activación, degradación, y transporte de proteínas. Estos procesos a su vez son esenciales para llevar a cabo de manera correcta eventos celulares importantes tales como progresión de ciclo celular, regulación de la expresión genética, y respuesta a estrés celular, entre otros. Por consecuencia Hsp90 es un componente clave que mantiene un correcto equilibrio dinámico de las funciones celulares (28). En mamíferos, Hsp90 constituye una familia de proteínas de choque térmico dependientes de ATP compuesta por 4 tipos: 2 isoformas citoplásmicas denominadas Hsp90 $\alpha$  y Hsp90 $\beta$  que se expresan de forma inducible y constitutiva, respectivamente, la Hsp90 mitocondrial (Trap1) y la Hsp90 residente en el retículo endoplásmico (Grp94), las cuales promueven la correcta conformación y activación de más de 200 proteínas conocidas como “clientes”. Las isoformas citoplásmicas son las más estudiadas y se sabe que su forma funcional se encuentra conformada por un homodímero y cada subunidad está dividida en tres dominios (Fig. 2). El dominio amino terminal que posee el sitio de unión a ATP, el cual es hidrolizado por la actividad ATPasa intrínseca de ese dominio, el dominio M o mediano, que interactúa principalmente con las proteínas cliente, aunque también es el sitio de unión de proteínas accesorias que promueven y regulan el correcto funcionamiento de la Hsp90 denominadas co-chaperonas, y por último se encuentra el dominio carboxilo, el cual es el punto de unión entre los dos monómeros y el sitio de unión de la mayoría de las co-chaperonas a través del pentapeptido MEEVD (29).

La Hsp90 citoplásmica es una proteína dinámica que experimenta cambios conformacionales en presencia de ATP y otras proteínas accesorias. En un estado inactivado, el homodímero se encuentra en forma abierta o en forma de V. La unión de ATP en el dominio N-terminal desencadena un reposicionamiento y dimerización de estos dominios; como resultado la Hsp90 adquiere una forma cerrada y activa en la

cual, como se explicará más adelante, la proteína cliente es plegada o estabilizada. Durante su función como chaperona, el ATP es hidrolizado liberando ADP+Pi con la subsecuente disociación del dominio N-terminal de cada monómero, por lo tanto la proteína regresa a su conformación original (Fig.2).



**Figura 2.-** Dominios estructurales de la Hsp90 citoplásmica y su cambio estructural mediado por ATP. A) HSP90 consiste de tres dominios: un dominio N-terminal (N) donde el ATP es reclutado; el domino mediano (M) o sitio de reclutamiento de los substratos; y el dominio de dimerización (C) con la secuencia de un pentapeptido MEEVD. B) Ciclo de ATP de la Hsp90. La Hsp90 libre de nucleótidos se encuentra en un estado abierto con sus dominios C-terminales constitutivamente dimerizados (izquierda). La unión de ATP en el dominio N-terminal induce cambios conformacionales, que resultan en un estado cerrado de la HSP90 (derecha). Durante su función como chaperona de proteínas cliente, el ATP es hidrolizado, lo que provoca que la Hsp90 regrese a su estado inactivado.

Las isoformas residentes en mitocondria y retículo endoplásmico, en comparación a las isoformas citoplásmicas, están menos caracterizadas. La organización de los dominios estructurales de la isoforma del retículo endoplásmico o Grp4 (Glucose-regulated protein 94) es similar a las isoformas citoplásmicas, sin embargo en el dominio C-terminal el pentapeptido MEEVD es remplazado por el péptido KDEL que le permite a Grp94 ser residente del retículo. La región N-terminal tiene un 53% de identidad con Hsp90 $\beta$  y también posee el sitio de unión de ATP, el cual es muy similar a las isoformas citoplásmicas, sin embargo, difiere en los primeros 50 aminoácidos, por lo que se piensa que el cambio conformacional en presencia de ATP podría ser diferente. El dominio M posee un 50% de identidad con Hsp90 $\beta$ . El sitio de unión de proteínas clientes no ha sido totalmente identificado (30). La isoforma mitocondrial o Trap-1 (Tumor necrosis factor receptor-assoiated protein-1) es la encargada de mantener la integridad de proteínas residentes en este organelo y al igual que el resto de las proteínas de esta familia, requiere de ATP para su funcionamiento (31). Una diferencia importante entre Grp94 y Trap-1 con respecto a la Hsp90 es que estas últimas requieren de varias co-chaperonas para asistir a sus proteínas clientes, mientras que las isoformas de organelos no las requieren.

### **2.5.2 Ciclo de chaperona de la Hsp90**

Durante la maduración de las proteínas cliente, Hsp90 funciona en coordinación con un gran conjunto de co-chaperonas, las cuales son cruciales para conducir la interacción entre Hsp90 y proteínas clientes. En células eucariontes se han identificado más de 20 co-chaperonas que regulan la función de Hsp90 de diferentes maneras, tal como la inhibición y activación de su actividad de ATPasa así como también el reclutamiento de proteínas cliente (32). Entre ellas, las co-chaperonas TPR (tetra-trico-peptide repeats), las cuales reconocen la secuencia MEEVD en el extremo C-terminal en la Hsp90 a través de un dominio de pinza altamente conservado, son un ejemplo prominente. Estructuralmente, los motivos TPR constan de 34 aminoácidos degenerados que forman 2  $\alpha$  hélices antiparalelas.

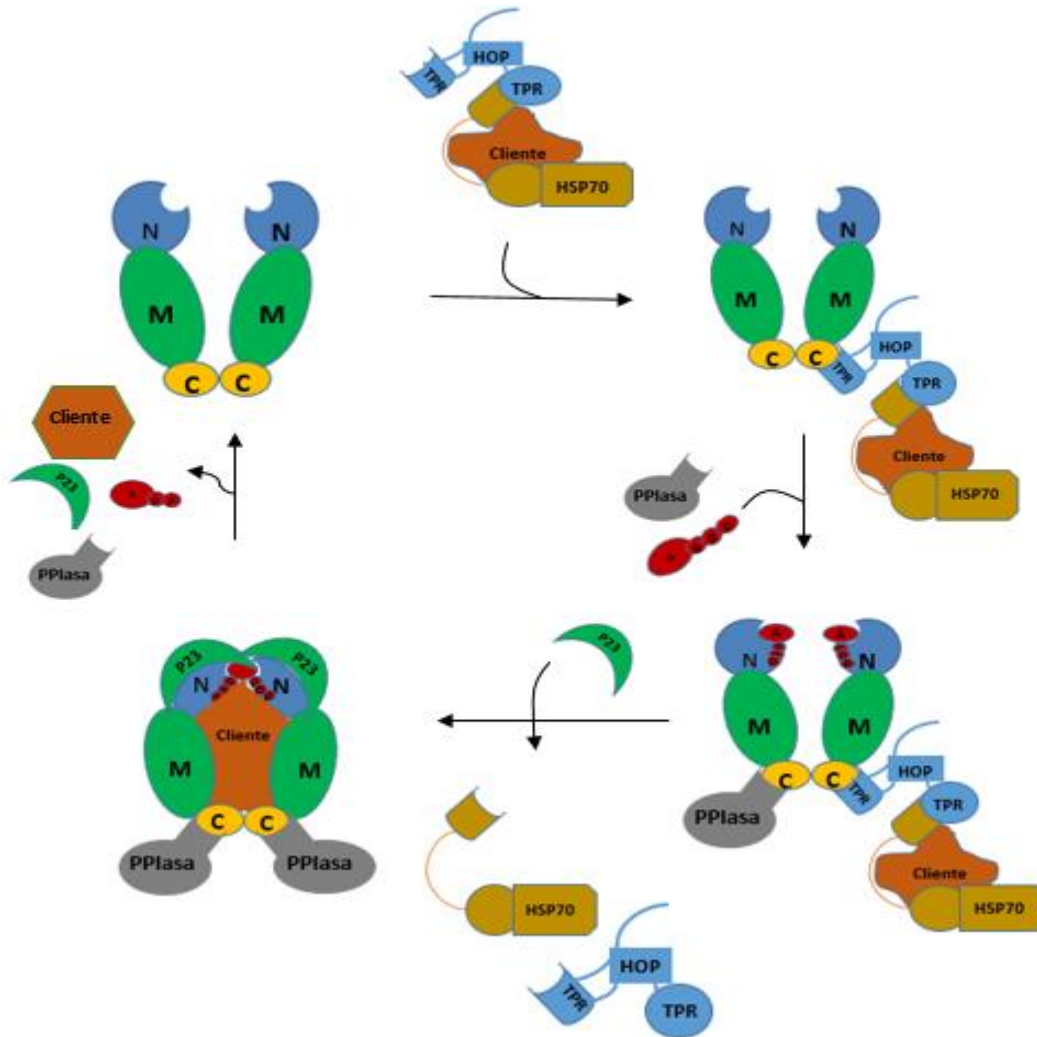


El mecanismo mejor caracterizado del ciclo de chaperona de la Hsp90 (Fig. 3) está basado en experimentos de reconstrucción realizados con el receptor de hormonas esteroideas (SHR). Primero, la proteína parcialmente plegada es reconocida por la chaperona Hsp70, la cual a su vez se une a la co-chaperona Hop (Hsp90-Hsp70 organizing protein) a través de su primer dominio TPR. Un monómero de la Hsp90 recluta el complejo Hsp:Hop:Cliente a través del dominio MEEVD que se une al segundo dominio TPR de la co-chaperona Hop. La unión de Hop con Hsp90 inhibe la actividad de ATPasa del dímero Hsp90. La secuencia MEEVD en el extremo C-terminal del monómero libre recluta a otra co-chaperona denominada PPIasa (peptidylprolylisomerase) originando un complejo molecular asimétrico. Este complejo asimétrico estable es capaz de reclutar una molécula de ATP al dominio terminal de cada monómero de la Hsp90, lo cual origina un cambio conformacional que lleva a una estructura cerrada y activa en la que la proteína cliente interactúa directamente con los dominios M y N-terminal de la chaperona molecular Hsp90. Para mantener estable la conformación cerrada de la HSP90 e inhibir parcialmente su actividad de ATPasa, la co-chaperona P23 es reclutada en el dominio N-terminal, lo cual a su vez debilita la unión del complejo Hsp:Hsp70 y promueve su liberación del resto del complejo. Los cambios conformacionales que se originan durante el plegamiento, estabilización o activación de proteínas cliente trae como consecuencia la unión de la co-chaperona Aha1 en el dominio M. La unión de Aha al complejo macromolecular acelera la progresión de la actividad de ATPasa, lo que provoca la hidrólisis de ATP con la subsecuente liberación de ADP+Pi, co-chaperonas y la proteína plegada (33).

### **2.5.3 Proteínas cliente de Hsp90**

Como se mencionó anteriormente, las proteínas en las cuales la Hsp90 actúa son colectivamente llamadas proteínas “clientes” y muchas de ellas participan en vías de transducción de señales. El número de proteínas celulares clientes de la Hsp90 se ha incrementado en años recientes y una lista actual de los “interactores” que no son co-chaperonas pueden descargarse del sitio web mantenido por el grupo del Dr. Picard (<http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>).

Hasta la fecha los estudios moleculares no han podido identificar una secuencia o motivo común de proteínas clientes que sea reconocido por la chaperona molecular Hsp90. Debido a la gran complejidad de proteínas, es probable que la asociación de Hsp90 sea determinada por una conformación y estructura terciaria de las proteínas clientes en lugar de una estructura primaria dictada simplemente por un orden en los aminoácidos. Un ejemplo se encuentra descrito con las cinasas Src. La chaperona molecular Hsp90 es capaz de unirse establemente con la cinasa viral Src (v-Src), pero solo interactúa de forma transitoria con su contraparte celular, la cinasa (c-SrC), aunque ambas proteínas son casi iguales (95% de identidad). A pesar de su alto porcentaje de identidad, c-Src es más resistente a la desnaturalización química o por calor que y la v-Src es más propensa a agregarse (34). Además, otras co-chaperonas pueden contribuir al proceso de selección y reconocimiento, por ejemplo, la co-chaperona CdC37 que parece ser específica para cinasas, mientras que la co-chaperona Sgt 1 participa en el plegamiento de proteínas tipo NLR (33).



**Figura 3.-** Ciclo de chaperona de la Hsp90. La proteína cliente es transferida de la Hsp70 a la Hsp90 a través de los dominios TPR co-chaperona adaptadora Hop. Una molécula de Hop se une al extremo C-terminal de un monómero de la Hsp90 estabilizando la forma abierta. El otro sitio receptor TPR del dominio C-terminal es ocupado por la co-chaperona PPIasa llevando a la formación de un complejo asimétrico. La Hsp90 adopta una forma cerrada y activa después de la unión de ATP. La co-chaperona P23 estabiliza la forma activa y cerrada de la Hsp90, lo que provoca la liberación de Hop. Otra co-chaperona PPIasa es reclutada al otro monómero de la Hsp90 formando un complejo tardío constituido por Hsp90, p23, PPIasa. Después de la hidrólisis de ATP las co-chaperonas y la proteína cliente plegada son liberadas.

## 2.6 Hsp90 y su implicación en la replicación viral

Los virus son parásitos intracelulares estrictos que son responsables de un gran número de enfermedades en humanos. Debido a la austeridad de sus genomas, los

virus son totalmente dependientes de una célula huésped para poder replicar. Actualmente hay fuerte evidencia para asegurar que la chaperona molecular Hsp90 es casi universalmente requerida para mantener una integridad de proteínas virales de virus con genomas de DNA y RNA tanto de polaridad positiva como negativa. Como pasa con muchas proteínas celulares, diferentes proteínas virales requieren de la Hsp90 para un correcto plegamiento, ensamblaje y maduración. De acuerdo con Geller (35), hasta la fecha, cualquier infección viral es sensible a los inhibidores de la Hsp90 a concentraciones en las que la viabilidad celular no se ve afectada

A continuación se hará una breve descripción de como la Hsp90 es esencial para la replicación de algunos virus

### **2.6.1 Paramyxoviruses y rhabdoviruses**

En células infectadas con el prototipo del virus de la estomatitis vesicular (rhabdovirus), la inhibición de la actividad de la Hsp90 por el tratamiento con geldanamicina y radicicol redujo la replicación viral en células infectadas con una multiplicidad de infección alta y baja. Asimismo, el silenciamiento de Hsp90 usando siRNAs también redujo la replicación viral. La inhibición de Hsp90 disminuyó únicamente la vida media de la proteína L, (subunidad mayor de la polimerasa del VSV) la cual se restauró cuando el proteosoma fue inactivado, por lo que los autores sugieren que esta proteína viral es cliente de la HSP90 y es degradada vía proteosomal cuando la chaperona esta inactiva. El efecto de los inhibidores de Hsp90 geldanamicina y radicicol en células infectadas con los virus de parainfluenza humana 2, 3 y el SV40 (paramyxovirus) tuvieron un efectos semejantes, en donde se observa una disminución en la producción de la proteína L, que forma parte de RNA polimerasa dependiente de RNA (36).

### **2.6.2 Flavivirus**

Un cliente de la Hsp90 es la proteína multifuncional NS3 del virus de la hepatitis C (HCV), la cual en el dominio N-terminal posee actividad de serina proteasa y el dominio C-terminal de NTPasa/helicasa. La actividad de proteasa es importante para realizar la escisión proteolítica entre NS2 y NS3. A través de ensayos de

inmunoprecipitación se determinó que la proteína NS2/3 traducida *in vitro* interactúa con Hsp90 a través de su dominio NTPasa/helicasa y que los inhibidores de la Hsp90 como el 17AAG y radicicol, disminuyeron la interacción con Hsp90 y la actividad de la proteasa (37).

El virus dengue (DENV), necesita de un complejo macromolecular conformado por chaperonas que se encuentran en la superficie de células de neuroblastoma y de macrófagos. Cuando estas células fueron infectadas con virus incubados previamente con la Hsp90 recombinante de humano, el porcentaje de infección se vio disminuido considerablemente. Al incubar monocitos y macrófagos con anticuerpos anti Hsp90 y anti Hsp70 y posteriormente realizar la infección con DENV, la producción de partículas virales se redujo, lo que sugiere que estas chaperonas forman parte de un complejo receptor el cual es utilizado por DENV para su internalización a la célula huésped (38).

### **2.6.3 Picornavirus**

La cápside de los picornavirus está formada por 60 copias de 4 subunidades, generadas por el corte de la proteína precursora de P1 por la proteasa viral 2A. La Hsp90 junto con la co-chaperona P23 son requeridas para el corte proteolítico de P1. Hsp90 induce una conformación de P1 que permite el reconocimiento y corte por la proteasa viral. Debido a que después del corte, Hsp90 no se asocia con las subunidades maduras de la cápside, se ha sugerido que reconoce un estado de P1 que se pierde después del corte (39).

### **2.6.4 Calicivirus**

Con respecto a la familia *caliciviridae*, el único reporte donde se ha estudiado la importancia de la Hsp90 fue publicado recientemente por Vashist (40) Mediante cromatografía de afinidad y ensayos de LUMIER, se determinó que la HSP90 interactúa con los extremos 5' y 3' del genoma del Norovirus murino (MNV) y con las proteínas virales VP1, NS1 y NS3, respectivamente. A pesar de la interacción de la Hsp90 con el genoma de MNV, los autores sugieren que este proceso no es tan relevante para promover una replicación eficiente del genoma viral, ya que al usar el

fármaco 17DMAG, un inhibidor del ciclo de chaperona de la Hsp90, el número de copias del RNA genómico se ve levemente afectado, sin embargo, la producción de la progenie viral se ve severamente reducida en comparación a las células infectadas y no tratadas. A pesar de que la cantidad de la mayoría de las proteínas virales no estructurales disminuyeron, la cantidad de proteínas estructurales VP1 y VP2 fue casi indetectable por ensayos de Western blot. Cuando células tratadas con el inhibidor anteriormente mencionado fueron transfectadas con el RNAsg y una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína VP1, la expresión de VP1 fue severamente afectada, lo que sugiere fuertemente que la proteína VP1 es cliente de Hsp90.

### **3. Justificación**

El estudio de la función de proteínas celulares unidas a diferentes componentes virales como la proteína VPg y el genoma de algunos miembros de la familia *Caliciviridae*, ha permitido determinar la importancia de las mismas en la regulación de su replicación.

Nuestro grupo de trabajo y otros, hemos reportado la interacción entre la proteína HSP90 con el genoma y proteínas estructurales y no estructurales del MNV.

Debido al papel primordial de la chaperona HSP90 en infecciones virales y en la replicación del MNV, es posible que también participe en la replicación del FCV, sugiriendo un papel regulatorio común para los virus de esta familia.

#### **4. Hipótesis**

La proteína Hsp90 es un factor de susceptibilidad a la infección por el calicivirus felino.



## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

- Determinar la participación de la proteína Hsp90 en el ciclo replicativo de FCV.

### **5.2 Objetivos particulares**

1. Determinar los patrones de expresión de la proteína Hsp90 $\beta$  durante el ciclo replicativo de FCV
2. Evaluar la localización subcelular de Hsp90 $\beta$  durante el ciclo replicativo del FCV y su posible interacción con factores virales.
3. Determinar si la Hsp90 participa en la replicación viral.

## **6. Metodología**

### **6.1 Cultivo celular y virus**

Las células CrFK obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD), fueron cultivadas en medio DMEM Advanced (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 2 mM de L-glutamina. El medio también fue suplementado con 10% de suero fetal bovino, 5,000 U de penicilina y 5 µg/ml de streptomina. El cultivo celular fue incubado con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Para los ensayos de propagación del FCV, las células se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 por 24 h, se congelaron y descongelaron tres veces, se centrifugaron a 5,000 rpm por 5 min y el sobrenadante se separó en alícuotas y se almacenó a -70° C como semilla viral. Para determinar el título viral se realizó un ensayo de placa en células CrFK.

### **6.2 Ensayos en placa**

Monocapas de células CrFK sembradas en multiplacas de 12 pozos a una confluencia del 70% fueron infectadas con diluciones seriadas de virus. . La absorción del virus se llevó a cabo durante 60 min a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> en movimiento a intervalos de 30 min. Posteriormente, el virus fue removido y a cada pozo, le fueron adicionados 500 µl de carboximetilcelulosa /CMC) al 2% diluida en MEM completo a una concentración final de 2% de suero y fueron incubados a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas, después, la CMC fue retirada y 350 µl de formaldehído al 3.7% en PBS fueron agregados. Después de 15 min de incubación con el formaldehído, éste fue retirado y 350 µl de cristal violeta (0.1 gr de cristal violeta, 29.9 ml de etanol absoluto y 70 ml de agua bidestilada estéril) fueron colocados a cada pozo. Las placas fueron lavadas y secadas para su posterior conteo.

### **6.3 Tratamiento de células infectadas con geldanamicina**

Células CrFK fueron sembradas en cajas de cultivo al ~90% de confluencia, y pre tratadas o no con geldanamicina en medio con suero al 2% por 13 horas. Posteriormente, el medio fue retirado y las células fueron infectadas con la cepa F9

de FCV a una MOI de 5 por 1 hora a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al finalizar el periodo de absorción viral, el inóculo viral fue retirado y las células fueron incubadas en ausencia o presencia de geldanamicina diluida en medio con suero al 2% a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. A los tiempos indicados, el medio fue colectado para cuantificar la progenie viral mediante ensayos en placa y las células fueron lavadas con PBS para posteriormente obtener los extractos proteicos. Para los ensayos de inmunofluorescencia las células fueron sembradas al ~70 % de confluencia sobre cubre-objetos y el tratamiento fue seguido de igual manera que el descrito anteriormente.

#### **6.4 Ensayos de viabilidad celular**

La citotoxicidad de la geldanamicina para células CrFK fue determinada mediante la reducción de MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega). Las células fueron sembradas en cajas de 96 pozos. Después de 24 horas de tratamiento con geldanamicina a diferentes concentraciones, cada pozo fue incubado con 50 µl de medio MEM sin suero y 10 µl del reactivo comercial a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% por 1 hora. Posteriormente, la absorbancia fue medida a 490 nm.

#### **6.5 Extractos proteicos**

Las células CrFK utilizadas para los distintos ensayos fueron lavadas 2-3 veces con PBS (NaCl 0.137M, KCl 2.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01M), despegadas empleando un raspador celular y colocadas en tubos cónicos de 1.5 ml. La pastilla celular fue obtenida mediante centrifugación a 19, 000 g por 10 min. Las células fueron lisadas con buffer RIPA (Tris-HCl 25mM [pH7.4], NaCl 150 mM, NP40 1% , SDS 0.01%, desoxicolato de sodio 0.5% e inhibidor de proteasas) por 10 min a 4° C. El contenido celular fue centrifugado a 19 000 g por 10 min y la cantidad de proteínas en el sobrenadante fue estimada mediante ácido bicinonínico (Pierce BCA protein Assay kit).

## 6.6 Análisis de proteínas por western blot

Diez  $\mu\text{g}$  de proteínas totales fueron analizados mediante electroforesis en geles desnaturizantes de proteínas (SDS-PAGE) al 10% y transferidos en cámara semi-seca a membranas de nitrocelulosa por 1 hora a 12 V. Las membranas fueron bloqueadas con leche 5% en TBS-tween por 1 hora a temperatura ambiente (TA) e incubadas toda la noche a 4° C con los anticuerpos primarios correspondientes. Las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-Tween por 10 min a TA e incubadas con anticuerpos secundarios acoplados a HRP por dos horas a TA. La membrana fue nuevamente lavada con TBS-Tween tres veces por 10 min a TA. Las proteínas de interés fueron detectadas mediante quimioluminiscencia en placas fotográficas.

## 6.7 Inmunofluorescencias

Las células CrFK fueron sembradas en cubreobjetos hasta obtener una confluencia de ~70 %. A los tiempos indicados el medio fue retirado y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en PBS por 20 min a TA y lavadas 3 veces con PBS con cloruro de amonio 50mM (PBS/ $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0.5% en PBS/  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y albumina sérica bovina (BSA) por 15 min a TA y bloqueadas con BSA en PBS/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios fueron incubados a 4° C toda la noche, y los secundarios 2 h a TA. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS/ $\text{NH}_4\text{Cl}$  por 5 min a TA e incubadas con DAPI por 2 min seguidos por 3 lavados con PBS/ $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Las células fueron montadas sobre portaobjetos utilizando Vectashield y analizadas por microscopia confocal.

## 6.8 Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia y Western blot

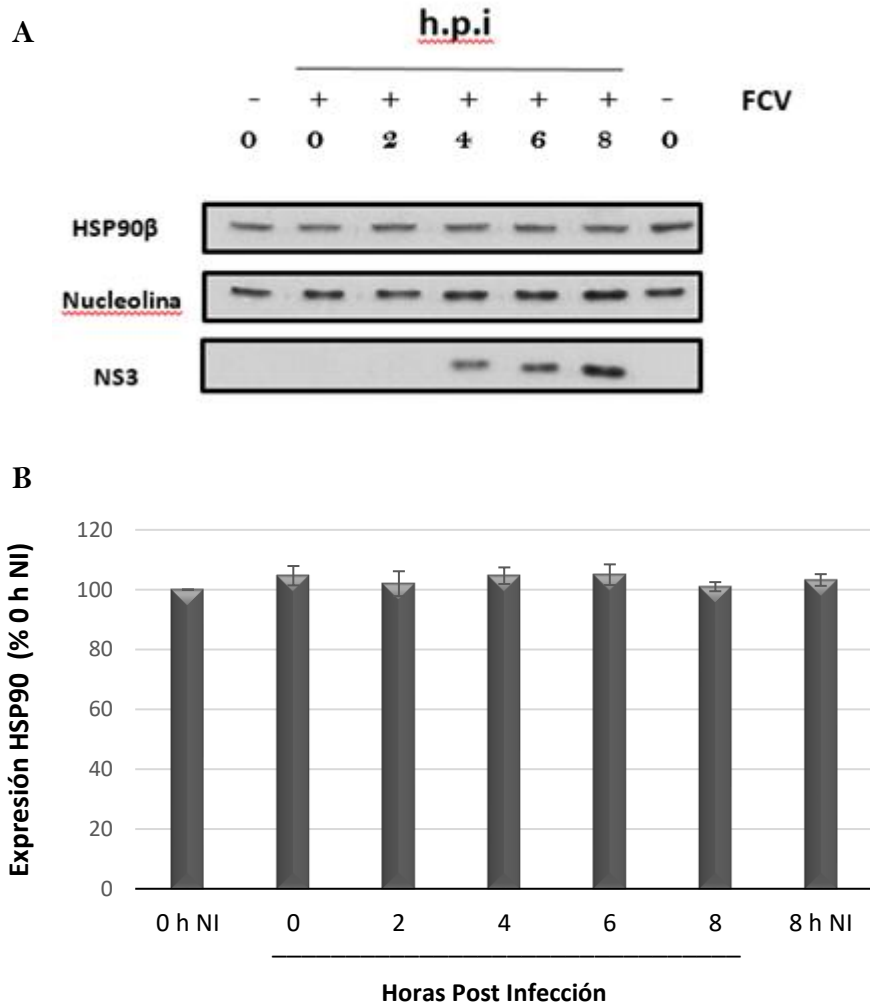
Anticuerpo $\alpha$	Dilución	Especie animal	Casa comercial
Hsp90 $\beta$ . WB, IF	1:5000, 1:100	Conejo	Santa Cruz
NS3. WB*	1:20000	Conejo	Casero
VP1, IF*	1:300	Ratón	Santa cruz

<b>Akt. WB</b>	1:20000	Ratón	Sigama
<b>Hsp70 WB</b>	1:2000	Cabra	Santa cruz
<b>Alexa Fluor® 488 α ratón .IF*</b>	1:300	Burro	Invitrogen
<b>Alexa Fluor® 594 α conejo .IF*</b>	1:300	Burro	Invitrogen
<b>IgG de cabra, ratón, conejo acoplado a HRP</b>	Cabra 1:20000 Ratón y conejo 1:10000	Burro	Invitrogen

## **7. Resultados**

### **7.1 Patrones de expresión de Hsp90 durante la infección por FCV**

En nuestro laboratorio se está estudiando el papel que tienen las proteínas de choque térmico en la progresión a la infección por FCV. Se encontró que la inducción de Hsp70 correlaciona con una reducción en el efecto citopático y en la salida de partículas de FCV, procesos que a su vez correlacionan con la inhibición de la activación de la caspasa-3, sugiriendo que el efecto negativo del choque térmico en la infección por FCV está asociado con el control de la apoptosis (41). La apoptosis es un proceso inducido por el FCV que se ha asociado con la liberación de la progenie viral y su propagación en el huésped. En este trabajo se propuso estudiar a la Hsp 90 durante la progresión a la infección por FCV. La Hsp90 participa directamente, a través de la estabilización de proteínas, en varios procesos celulares implicados en mantener un equilibrio dinámico celular. Muchos de estos procesos son alterados o modulados durante infecciones virales, por lo que los virus son propensos a manipular chaperonas moleculares con el objetivo de conducir a una replicación exitosa. Por lo tanto, primeramente quisimos determinar si la infección por FCV modulaba la expresión de Hsp90, considerada la chaperona molecular por excelencia. Mediante ensayos de Western blot, se determinó que la expresión de la proteína Hsp90 $\beta$  (84KDa) evaluada en una cinética de infección de 0, 4, 6 y 8 hpi, no es modulada en relación a la expresión de la HSP90 de células no infectadas (Figura 4 A y B). Como control de carga se analizó la expresión de nucleolina, una proteína que no es modulada en la replicación de FCV, mientras que la expresión de la proteína viral p39 (NS3) fue evaluada para confirmar la infección por FCV. NS3 fue detectada a partir de las 4 h post-infección.



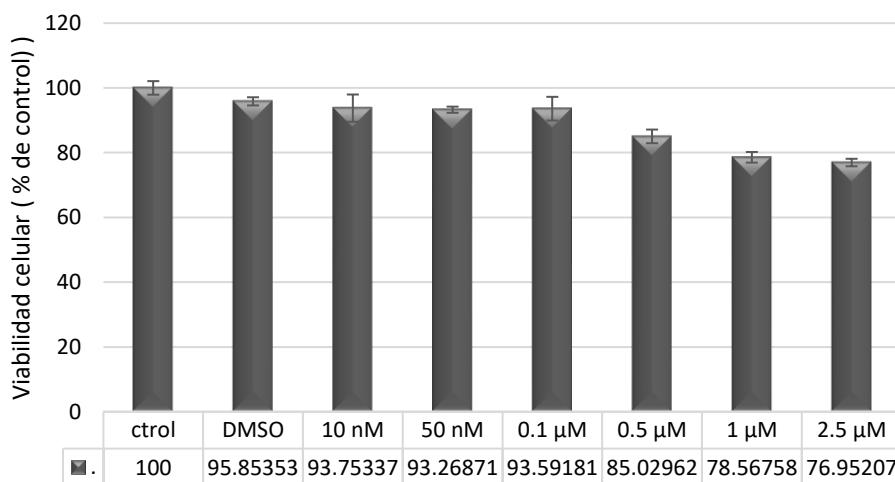
**Figura 4.- Niveles de Expresión de la HSP90 durante la infección por FCV.** A) Extractos proteicos totales de células CrFK no infectadas (carril 1 y 7) e infectadas (carriles 2-6) fueron utilizados para evaluar la expresión de la HSP90 $\beta$  mediante ensayos de Western blot (ver materiales y métodos para descripción). Como control interno y control de infección se utilizaron anticuerpos  $\alpha$  nucleolina y  $\alpha$  NS3, respectivamente. B) Los niveles relativos de la proteína HSP90 $\beta$  fueron cuantificados midiendo la intensidad de las bandas y normalizados con respecto a la cantidad de nucleolina. Los datos están expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

## 7.2 Efecto citotóxico de la geldanamicina e inhibición de la HSP90

Dado que la expresión de la Hsp90 no se ve modulada negativamente durante la infección por FCV, quisimos evaluar si esta proteína podría participar en la replicación viral, por lo que se decidió evaluar el efecto de la geldanamicina, un inhibidor de la Hsp90, en el desarrollo del efecto citopático y en la producción de la

progenie viral. Se ha tomado como dogma emplear antibióticos de diferentes tipos, específicamente las ansamicinas, para estudiar la función de chaperona de Hsp90. El inhibidor clásico de tipo ansamicina, la geldanamicina, así como sus derivados se asocian al sitio de unión de nucleótidos en el dominio N-terminal de la Hsp90 con mayor afinidad que el ATP. Esto trae como consecuencia la inhibición de la actividad de chaperona.

El efecto citotóxico de la geldanamicina sobre células CrFK fue examinado mediante la reducción de MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]. Debido a que las concentraciones reportadas para el uso de la geldanamicina en diferentes líneas celulares van desde 10 nm hasta 10  $\mu$ M, se evaluaron concentraciones que estuvieran dentro de este rango; 10 nm, 50 nm, 0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 2.5  $\mu$ M. Células CrFK fueron tratadas por 24 h debido a que este fue el tiempo que abarca el pre-tratamiento con el fármaco y la cinética de la infección con FCV. Las concentraciones de geldanamicina en las cuales la viabilidad celular se mantiene superior al 85% son 10 nm, 50 nm, 0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, mientras que el resto de las concentraciones la viabilidad disminuye por debajo del 80%. (Fig. 5).



**Figura 5.- Viabilidad celular en presencia de geldanamicina.** Células CrFK fueron sembradas en placas de 96 pozos y tratadas con diferentes concentraciones de geldanamicina por 24 horas. La



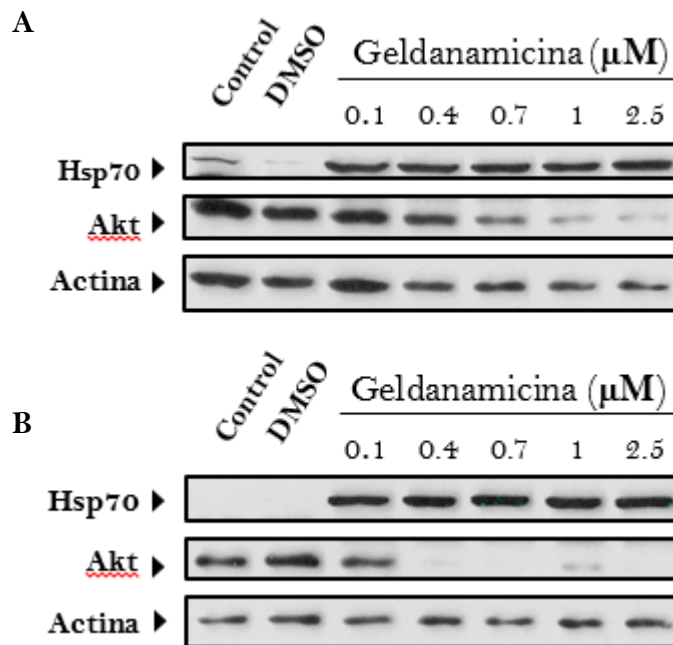
viabilidad celular fue medida a través de ensayos de MTS. Los datos están expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

La inhibición de la actividad de Hsp90 con moléculas competidoras de ATP que se unen en su extremo N-terminal, trae como resultado la degradación a través de la vía ubiquitín/proteosoma, de varias proteínas clientes tales como Akt, Cdk4, Raf-1, v-Src, Bcr-AbL, ErbB2 y p53 [Revisado en (42)]. Por lo tanto, para determinar las concentraciones de geldanamicina en las cuales la función de la Hsp90 es inhibida, el nivel de expresión de Akt fue evaluado por medio de Western blot. Debido a que la degradación metabólica de las proteínas clientes de Hsp90 podría requerir aproximadamente 12 h (43, 44) y para permitir que la Hsp90 estuviera inhibida desde el inicio de la infección, las células fueron tratadas por 13 h con el fármaco. Asimismo, para corroborar la inactivación de Hsp90 durante la cinética de infección, el nivel de Akt también fue evaluado 24 horas posterior al tratamiento de la droga. El nivel de Akt se disminuyó a un 65% cuando las células fueron tratadas por 13 h a 0.1  $\mu$ M de geldanamicina. Los niveles de esta proteína se redujeron a medida que las concentraciones de la droga aumentaron (Fig. 6A), de tal manera que a partir de concentraciones de 0.4  $\mu$ M, Akt es casi indetectable a las 24 h de tratamiento (Fig. 6B).

La función de Hsp90 es regulada por el factor de choque térmico 1 (HSF-1) (por sus siglas en inglés: Heat shock factor 1), por lo que en condiciones de no estrés, Hsp90 está generalmente unida a HSF1 y mantiene al factor de transcripción en un estado monomérico e inactivo. El choque térmico, estrés, o la inhibición de Hsp90 liberan a HSF-1 de la chaperona molecular, lo que resulta en una trimerización, activación y translocación al núcleo donde inicia la respuesta de choque térmico, manifestada por la producción de Hsps tales como Hsp70 y Hsp40 (45). Es por ello que los niveles de expresión de Hsp70 fueron evaluados como un segundo control de la inactivación de Hsp90. En todas las concentraciones de geldanamicina probadas, se observó un aumento en la expresión de HSP70, tanto a las 13 como a las 24 h, confirmándose nuevamente que este fármaco está activo (Figura 6B). Además, en células no tratadas o tratadas con DMSO (vehículo donde se disolvió la geldanamicina), ni la expresión

de la proteína HSP70 o la disminución de Akt fueron evidentes a ninguno de los tiempos estudiados (Figura 6, carriles 1 y 2)

Debido a que a las 13 h, entre 0.4  $\mu\text{M}$  y 0.7  $\mu\text{M}$  de geldanamicina, hay una disminución de más del 50% de Akt, y un aumento en la expresión de HSP70; y a que por otro lado, a las 24 h en todas las concentraciones los niveles de Akt no son detectables y que la viabilidad celular se mantiene por arriba del 85% con 0.5  $\mu\text{M}$  (Fig. 5), nosotros decidimos utilizar una concentración de 0.5  $\mu\text{M}$  de geldanamicina para llevar a cabo los ensayos de infección.

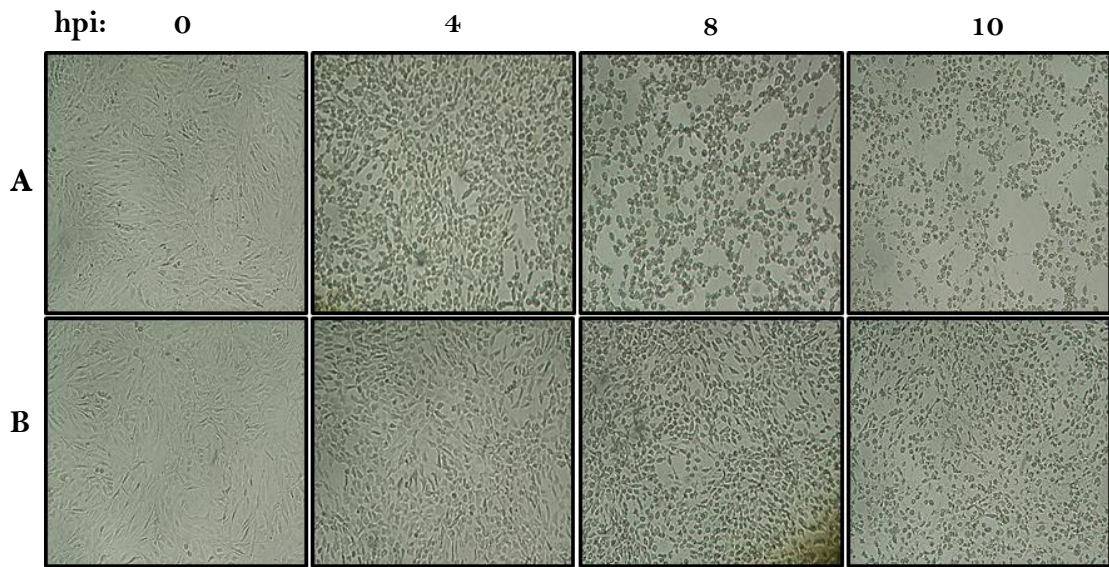


**Figura 6.- Efecto de la geldanamicina en la expresión de las proteínas HSp70 y AKT.** Extractos proteicos provenientes de células CrFK no tratadas (carril 1), tratadas con DMSO (carril 2) o con geldanamicina a concentraciones de 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.4  $\mu\text{M}$ , 0.7  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 2.5  $\mu\text{M}$  (carriles 2-6, respectivamente) por 13 (A) y 24 (B) h, fueron utilizados para evaluar la inactivación de Hsp90 por el tratamiento mediante la expresión de Akt y Hsp70. Actina fue utilizada como control de carga.

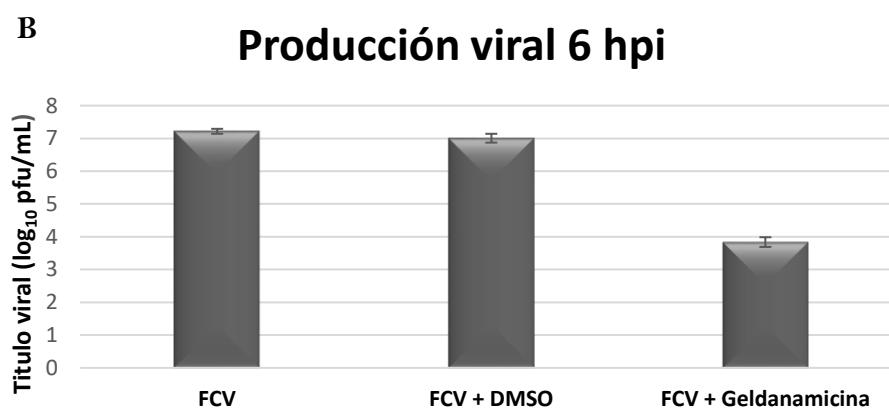
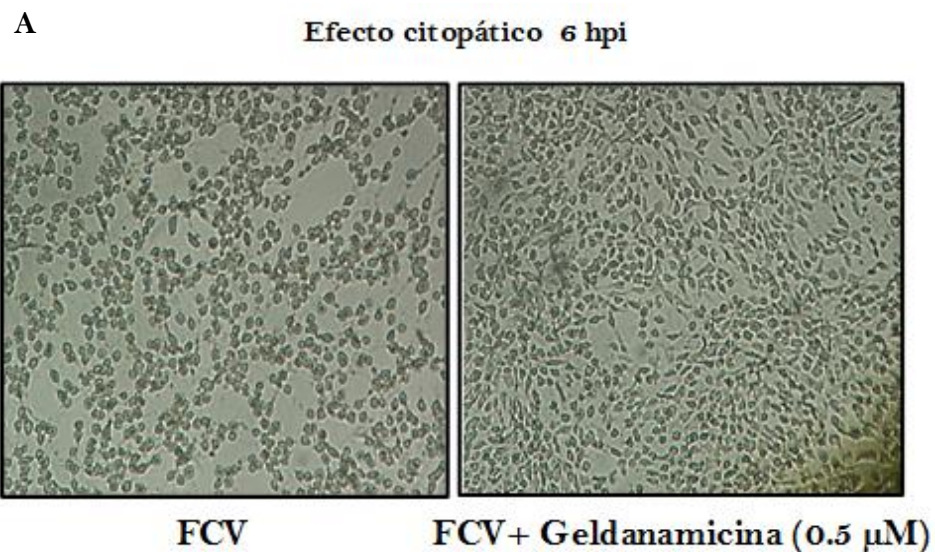
### **7.3 Efecto de la inhibición de la Hsp90 por el tratamiento de geldanamicina en la infección por FCV.**

Para evaluar el efecto del inhibidor de Hsp90 (geldanamicina) durante la progresión del efecto citopático (ECP) y en la generación de partículas virales infecciosas, la línea celular CrFK fue tratada con 0.5  $\mu$ M de geldanamicina por 13 h, e infectada con FCV a una MOI de 5. Después de 1 hora de incubación con el inoculo viral, éste fue retirado de las células y se les añadió medio fresco con geldanamicina 0.5  $\mu$ M. El efecto citopático fue observado a 0, 4, 8 y 10 hpi mediante ensayos de microscopía de luz (Fig. 7). En las imágenes, podemos observar que durante el progreso de la infección, las células se redondearon a partir de las 4 hpi, y empezaron a desprenderse de la monocapa celular, por lo que a las 8 y 10 hpi, se observa la formación de huecos o calvas en los campos analizados y a las 10 h se presentó una densidad celular claramente disminuida (Fig. 7A). Sin embargo, las células tratadas con la geldanamicina, mostraron un claro retraso en el efecto citopático producido por la infección con el FCV; a las 4 hpi, la monocapa se mantuvo íntegra (Fig. 7B), y a las 8 y 10 hpi se observó el redondeamiento celular, sin embargo, no se observaron todavía huecos en la monocapa (Fig. 7B). Estos resultados sugieren, que la inactivación de la proteína HSP90, trae como consecuencia la reducción del efecto citopático causado por el FCV en células CrFK.

Dado que la reducción en el efecto citopático se relaciona directamente con una menor producción viral, decidimos evaluar la producción de la progenie viral en las células tratadas con geldanamicina. Para determinar el posible efecto antiviral de la geldanamicina, los sobrenadantes de las células infectadas a las 6 hpi, a las cuales les fue corroborado el retraso en el efecto citopático (figura 8B), fueron colectados y la presencia de partículas virales fue evaluada por ensayos en placa. Como se muestra en la figura 8B, una reducción en la producción de partículas del FCV de más de 3 órdenes de magnitud fue observada en células tratadas con geldanamicina, en comparación a las células infectadas no tratadas o tratadas con DMSO (vehículo en el cual se disolvió la droga), indicando que la Hsp90 es una proteína que participa activamente para promover una replicación eficiente de FCV.



**Figura 7.- Efecto de la geldanamicina en el efecto citopático producido por el FCV.** Células no tratadas (A) o tratadas por 12 h con 0.5  $\mu$ M de geldanamicina (B), fueron infectadas con el FCV a MOI de 5 por 0, 4, 8 y 10 hpi. El efecto citopático producido fue observado por microscopia de Luz. Se muestra un resultado típico de 3 repeticiones independientes

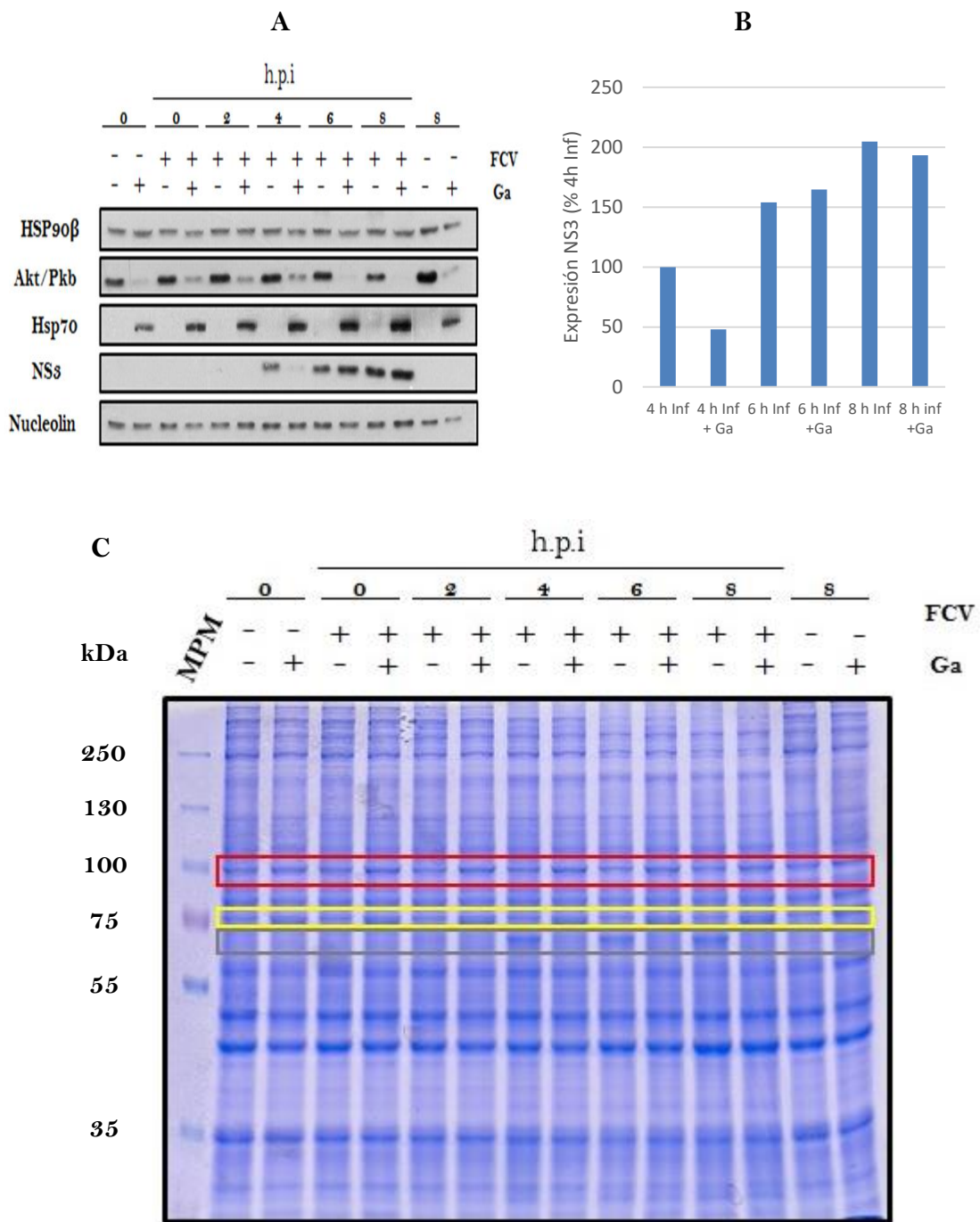


**Figura 8.- Efecto de la geldanamicina en la producción de partículas virales de FCV.** Células CrFK fueron tratadas o no con 0.5  $\mu$ M de geldanamicina e infectadas con el FCV. A las 6 hpi se corroboró el retraso en el efecto citopático por ensayos de microscopía de luz (A) y se cuantificó la producción viral por ensayos de placa (B). Los datos están expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

#### 7.4 Posible papel de la HSP90 en la replicación de FCV

La HSP90 es una chaperona molecular y se sabe que su actividad es requerida para el correcto plegamiento de proteínas no solo celulares sino también virales. La inhibición de la actividad de la HSP90 lleva en muchas ocasiones a la degradación

específica de estas proteínas virales (35). Por lo que examinamos, durante una cinética de infección, el efecto que tiene la geldanamicina en los niveles de la proteína no estructural NS3 y de la proteína estructural VP1 de FCV. Los niveles de la proteína NS3 fueron evaluados mediante ensayos de Western blot en los cuales también se determinaron los niveles de Hsp70 y Akt como indicadores de la inhibición de la Hsp90. En todos los tiempos post infección la expresión de Akt disminuyó en células tratadas, y la de la proteína Hsp70 aumentó. Los niveles de Hsp90 en ninguna condición fueron modulados, como era de esperarse, mientras que a las 4 horas post – infección el patrón de expresión la proteína NS3 disminuyó en extractos provenientes de células tratadas, sin embargo, los niveles de esta proteína se recuperaron en los tiempos posteriores analizados (Fig. 9A y B). Los extractos proteicos utilizados para determinar el nivel de expresión de la proteína estructural NS3 fueron analizados en SDS-PAGE y teñidos con azul de Coomassie (fig. 9 B). Un perfil proteico diferencial entre células infectadas tratadas y no tratadas fue notable al menos en la expresión de tres bandas: una de aproximadamente 70 kDa (enmarcada en amarillo), que podría tratarse de la Hsp70 ya que se encuentra sobre expresada en células que fueron tratadas con geldanamicina. También se pudo apreciar un aumento en una banda de aproximadamente 100 kDa (recuadro rojo) y una de aproximadamente 60 kDa, que podría corresponder a VP1 (recuadro gris). debido a que: 1) coincide con el peso molecular de esta proteína viral, 2) que se encuentra disminuida en células tratadas las cuales originan menos progenie viral y 3) su inducción ocurre a las 4 hpi (carril 7), tiempo en el cual se ha reportado que comienza la detección de VP1 en las células infectadas (26). Además, esta banda no está presente en células no infectas (carriles 2 y 3), por lo que se descarta la opción de que se trate de una proteína celular que sea disminuida por la acción de la geldanamicina.



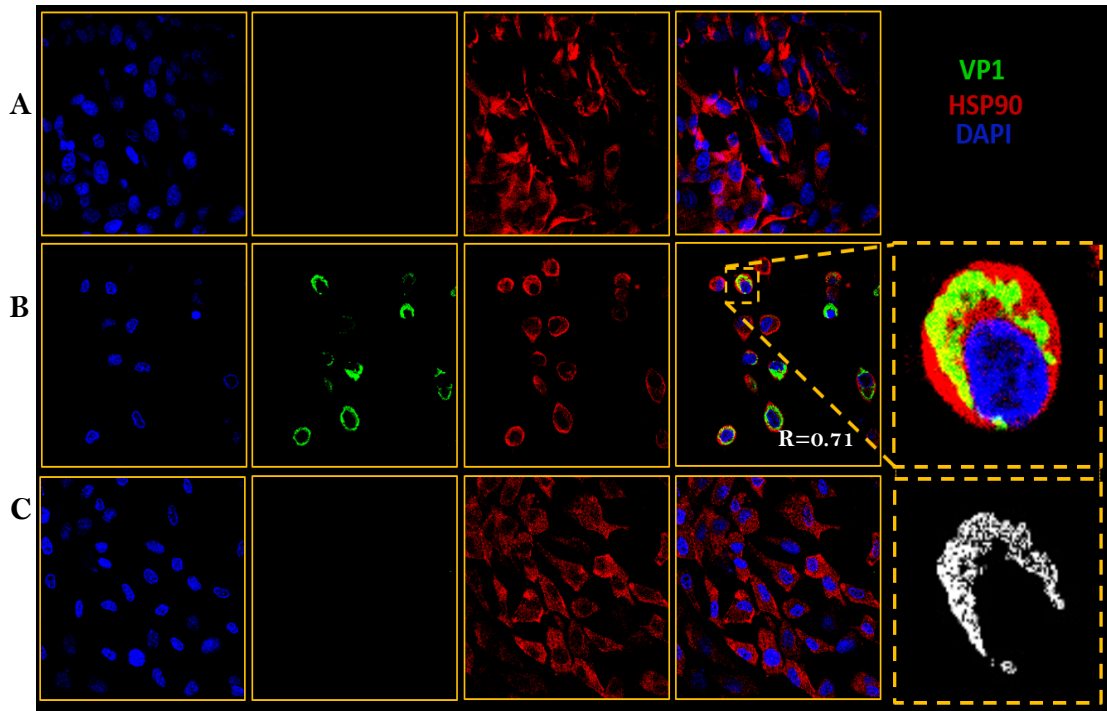
**Figura 9.- Expresión de FCV-NS3 durante la inactivación de HSP90.** Células CrFK fueron tratadas o no con 0.5  $\mu$ M de geldanamicina e infectadas con el FCV. A los tiempos indicados las células fueron lisadas y los extractos proteicos fueron analizados por Western blot con los anticuerpos indicados para la detección de Akt, HSP90, Hsp70 y NS3. B) Análisis densitométrico relativo de la

expresión de NS3. C) En paralelo, los extractos proteicos fueron corridos en SDS-PAGE 10% y teñidos con azul de coomasie. Se observan bandas diferenciales en extractos proteicos de células infectadas tratadas y no tratadas con geldanamicina de alrededor de 100 kDa (recuadro rojo) y 70 kDa (recuadro amarillo) presentes desde el inicio de la cinética tanto en células infectadas como no infectadas. Una banda de alrededor de 60 kDa (recuadro verde) se detectó en células infectadas a las 4, 6 y 8 hpi, y no a los mismos tiempos en las células tratadas e infectadas.

Aunque los resultados anteriores sugieren que la proteína VP1 podría estar inhibida por el tratamiento con geldanamicina, la evaluación de la expresión de esta proteína se analizó mediante microscopia de fluorescencia ya que el anticuerpo tiene reactividad únicamente en estos ensayos. La expresión de VP1 fue claramente detectada en células infectadas no tratadas (figura 10 B), mientras que en las células no infectadas o infectadas tratadas con geldanamicina, no se detectó a la proteína VP1 (fig. 10 c).

En células infectadas no tratadas se pudo observar un cierto grado de co-localización entre Hsp90 y VP1 que, dependiendo de los campos y cortes ópticos analizados, varió entre 0.50 a 0.75. La microfotografía mostrada en la figura 10B mostró un coeficiente de colocación de 0.71. Estos datos indican que VP1 y la chaperona molecular Hsp90 podrían estar interactuando, lo que sugeriría que la proteína principal de cápside es cliente de la chaperona molecular Hsp90.





**Figura 10.- Expresión de FCV-VP1 durante la inactivación de HSP90.** Células CrFK no infectadas (A) infectadas a MOI de 5 (B) e infectadas y tratadas con geldanamicina (C) fueron, fijadas con paraformaldehído a las 6 hpi y co-teñidas con (DAPI) y anticuerpos anti Hsp90 (rojo) y VP1 (Verde). A la derecha de la figura se muestra una ampliación para resaltar lo colocalización entre VP1 y HSP90. El coeficiente de colocalización de todo el campo visual fue de 0.71.

## 8. Discusión

Las proteínas HSPs son una familia de proteínas evolutivamente muy conservada cuya expresión incrementa en respuesta a una variedad de estímulos metabólicos y de estrés. A pesar de su designación, muchas de las HSPs son expresadas constitutivamente y realizan funciones esenciales. La notable es su función como chaperonas moleculares, facilitando la síntesis y plegamiento proteico en toda la célula. Además, se ha demostrado que las HSPs participan en el ensamble, secreción, tráfico y degradación de proteínas.

En nuestro laboratorio se ha estudiado el papel que tienen algunas HSPs en la replicación de FCV. El aumento en la expresión de la HSP70 mediante la inducción de choque térmico correlacionó con una disminución de la progenie viral liberada al medio extracelular y con una represión de la activación de la caspasa-3, sugiriendo que el efecto negativo del HS en la infección por FCV está asociado con el control de la apoptosis (41). Si bien consideramos que algunas HSPs inducibles podrían estar afectando la replicación de FCV, especulamos que otras chaperonas moleculares podrían participar en la replicación de FCV, específicamente las que se expresan de forma constitutiva cuya función es participar en vías moleculares importantes y esenciales para mantener la homeostasis celular a través del plegamiento proteico. En este trabajo decidimos estudiar una chaperona molecular que en condiciones basales se exprese de manera constitutiva. Empezamos a estudiar a la Hsp90 debido a que es considerada la chaperona molecular por excelencia y es universalmente requerida para la replicación viral a través de la estabilización de proteínas virales con diferentes funciones (35).

Dado que la maquinaria de chaperonas, entre ellas la Hsp90, regulan varios procesos celulares que son alterados en las infecciones virales, los virus son propensos a manipular o modular a estas proteínas. Es por ello que en primer lugar evaluamos los patrones de expresión de la Hsp90 $\beta$ . Como se mostró en la figura 4, no hay un aumento o disminución de la Hsp90 durante la replicación de FCV. En células eucariontes, la Hsp90 $\beta$  es una de las proteínas citoplásmicas más abundantes, llegando a abarcar aproximadamente el 2% de todas las proteínas celulares, por consiguiente se podría predecir que FCV no necesitaría aumentar los niveles basales

de HSP90 $\beta$ . El hecho de que esta proteína no disminuya, podría sugerir que el virus puede requerir de vías moleculares en las cuales participen proteínas celulares clientes de la Hsp90.

Por otra parte, se sabe que los niveles de las chaperonas moleculares, entre las que se encuentra Hsp90, corresponden y coinciden con los niveles generales de proteínas, de manera que las proteínas que lo requieran puedan tener un plegamiento adecuado (46). Tomando esto en cuenta, que los niveles de proteínas celulares disminuyen a medida que aumenta las proteínas virales de FCV (25) y que la función de Hsp90 es esencial para el plegamiento de varias proteínas de diferentes virus, se podría también pensar que alguna proteína de FCV necesitaría ser asistida por Hsp90 y por consiguiente los niveles de Hsp90 se mantienen constantes. Para empezar a evaluar esta última hipótesis analizamos la expresión de proteínas no estructurales y estructurales (fig. 9 y 10, respectivamente).

Si bien observamos que durante el tratamiento con la geldanamicina ocurre una disminución de NS3 a tiempos tempranos de la infección (4 hpi), ésta recupera niveles semejantes a los de las células no infectadas a tiempos posteriores (6 y 8 hpi; fig. 9); sin embargo la reducción de la proteína que muestra una migración electroforética similar a la de la proteína estructural VP1 es muy drástica a las 6 hpi; Este hecho aunado a la dramática disminución en la producción de partículas virales a este mismo tiempo, en donde es evidente que la producción de proteínas NS no se modifica, sugiere que la proteína VP1 es probablemente una cliente de la Hsp90.

Vashits y colaboradores determinaron que durante la inactivación de la Hsp90 la expresión de las proteínas no estructurales del MNV se reduce como consecuencia de una leve repercusión en la replicación de RNA viral, sin embargo, la proteína VP1 fue casi indetectable. Además, comprobaron una interacción entre VP1 y Hsp90, que indica que la VP1 del MNV es cliente de Hsp90 (40). Algunos virus, en particular los virus citopáticos, deben de producir grandes cantidades de un número limitado de proteínas virales dentro de un periodo corto de tiempo. La complejidad única y los requisitos estructurales de las cápsides virales hacen a sus precursores particularmente vulnerables a la agregación y mal plegamiento (39). Por lo tanto, proteínas de la cápside deben plegarse a una conformación adecuada que preceda la

conformación final de la cápside para ensamblar el genoma viral y formar la estructura del virión, el cual puede contener cientos de subunidades idénticas. Debido a la gran similitud entre los genomas de los virus de esta familia, a que la proteína VP1 del FCV fue indetectable cuando la Hsp90 fue inactivada, y que un alto grado de cercanía o co-localización entre estas dos proteínas fue observado, sugerimos que la proteína estructural VP1 del FCV es una posible proteína cliente de la proteína de choque térmico 90.

Los ensayos de inmunofluorescencia realizados en este trabajo, aunque no nos permitieron confirmar una interacción entre la Hsp90 y VP1, nos indican que podría haber una asociación entre estos dos elementos. Además, una interacción física debería ser considerada como una evidencia débil de que la Hsp90 modula la función de un producto génico, ya que las interacciones proteína - proteína son promiscuas *in vitro*. Por lo tanto, en muchas ocasiones se debe de determinar una interacción funcional, donde la manipulación de la función de la Hsp90 impacta el producto génico que interactúa con la chaperona o repercute en su función (por ejemplo, que se comprometa la expresión de la proteína en ensayos de Western blot) (47). De tal manera que el ensayo de inmunofluorescencia en el cual se mostró una ausencia de la proteína VP1 en presencia de la Hsp90 inactiva es considerado un ensayo funcional.

Es razonable esperar que un compañero de la Hsp90, ya sea funcional o una subunidad reguladora, también deberían interaccionar con la Hsp90. De tal manera que tanto la interacción física y funcional son evidentes en un gran número de estudios y representan el estándar de oro para demostrar su asociación con la Hsp90 (47). Por lo tanto, será importante determinar la interacción proteína-proteína y verificar la interacción funcional entre Hsp90 y VP1 a través de ensayos de tipo blotting para verificar que VP1 es cliente de la HSP90.

Nosotros encontramos que la progenie viral disminuye más de 3 unidades en escala logarítmica cuando la Hsp90 no es funcional. Cabría la posibilidad de que esta reducción se deba a vías moleculares alteradas donde participan proteínas cliente de la Hsp90 que sean importantes para sostener una replicación viral, y al no estar presentes debido a la degradación proteosomal, la progenie viral se vería comprometida, o por lo contrario, que se activen vías de señalización que sean

perjudiciales para el virus. Un ejemplo de esta última posibilidad es la inducción de la Hsp70 que se genera cuando la Hsp90 está inhibida. Por lo que comprobar que VP1 es altamente dependiente de Hsp90 nos permitiría descartar las 2 posibilidades anteriormente mencionadas o por lo menos ser el principal motivo por el cual la replicación de FCV se ve comprometida.

## **9. Conclusión**

En este trabajo demostramos que la Hsp90 es importante para sostener una replicación eficiente, ya que al inactivar la función de chaperona molecular mediante el uso de la geldanamicina, el efecto citopático se retrasó considerablemente y la producción de la progenie viral fue significativamente afectada. Además, los ensayos con geldanamicina también sugieren que la proteína VP1, es una proteína cliente de Hsp90 y que por lo tanto Hsp90 pudiera estar participando durante la morfogénesis viral en el correcto ensamblado del virión.

## **10. Perspectivas**

- \*Determinar la interacción física entre VP1 y HSP90
- \*Corroborar la interacción funcional mediante experimentos de tipo blotting dentro de un contexto de infección y fuera de éste mediante la sobreexpresión de VP1
- \*Determinar la vía por la cual VP1 es degradada.
- \* Evaluar por RT-PCR cuantitativo los niveles de RNA viral en presencia y ausencia de geldanamicina para así delimitar mejor el paso durante el ciclo de replicación viral de la Hsp90.

## 11. Referencias

1. Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, et al. Taxonomy of the caliciviruses. *The Journal of infectious diseases*. 2000;181 Suppl 2:S322-30.
2. Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Archives of virology*. 2010;155(1):133-46.
3. Blanton LH, Adams SM, Beard RS, Wei G, Bulens SN, Widdowson MA, et al. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(3):413-21.
4. Svraka S, Duizer E, Vennema H, de Bruin E, van der Veer B, Dorresteyn B, et al. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(5):1389-94.
5. Sosnovtsev S, Green KY. RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity. *Virology*. 1995;210(2):383-90.
6. Radford AD, Coyne KP, Dawson S, Porter CJ, Gaskell RM. Feline calicivirus. *Veterinary research*. 2007;38(2):319-35.
7. Coyne KP, Gaskell RM, Dawson S, Porter CJ, Radford AD. Evolutionary mechanisms of persistence and diversification of a calicivirus within endemically infected natural host populations. *Journal of virology*. 2007;81(4):1961-71.
8. Radford AD, Dawson S, Ryvar R, Coyne K, Johnson DR, Cox MB, et al. High genetic diversity of the immunodominant region of the feline calicivirus capsid gene in endemically infected cat colonies. *Virus genes*. 2003;27(2):145-55.
9. Clay S, Maherchandani S, Malik YS, Goyal SM. Survival on uncommon fomites of feline calicivirus, a surrogate of noroviruses. *American journal of infection control*. 2006;34(1):41-3.
10. Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of caliciviruses. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(8):4538-43.
11. Pedersen NC, Hawkins KF. Mechanisms for persistence of acute and chronic feline calicivirus infections in the face of vaccination. *Veterinary microbiology*. 1995;47(1-2):141-56.
12. Radford AD, Willoughby K, Dawson S, McCracken C, Gaskell RM. The capsid gene of feline calicivirus contains linear B-cell epitopes in both variable and conserved regions. *Journal of virology*. 1999;73(10):8496-502.
13. Green KY, Kapikian AZ, Valdesuso J, Sosnovtsev S, Treanor JJ, Lew JF. Expression and self-assembly of recombinant capsid protein from the antigenically distinct Hawaii human calicivirus. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(7):1909-14.
14. Guo M, Qian Y, Chang KO, Saif LJ. Expression and self-assembly in baculovirus of porcine enteric calicivirus capsids into virus-like particles and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for antibody detection in swine. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(4):1487-93.
15. Di Martino B, Marsilio F, Roy P. Assembly of feline calicivirus-like particle and its immunogenicity. *Veterinary microbiology*. 2007;120(1-2):173-8.
16. Di Martino B, Marsilio F. Feline calicivirus VP2 is involved in the self-assembly of the capsid protein into virus-like particles. *Research in veterinary science*. 2010;89(2):279-81.
17. Carter MJ. Transcription of feline calicivirus RNA. *Archives of virology*. 1990;114(3-4):143-52.
18. Sosnovtsev SV, Sosnovtseva SA, Green KY. Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *Journal of virology*. 1998;72(4):3051-9.

19. Stuart AD, Brown TD. Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 1):177-86.
20. Stuart AD, Brown TD. Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *Journal of virology*. 2006;80(15):7500-9.
21. Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *Journal of virology*. 2002;76(14):7060-72.
22. Herbert TP, Brierley I, Brown TD. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *The Journal of general virology*. 1997;78 ( Pt 5):1033-40.
23. Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, et al. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO reports*. 2005;6(10):968-72.
24. Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *The EMBO journal*. 2003;22(11):2852-9.
25. Willcocks MM, Carter MJ, Roberts LO. Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF4G and inhibition of host-cell protein synthesis during feline calicivirus infection. *The Journal of general virology*. 2004;85(Pt 5):1125-30.
26. Kuyumcu-Martinez M, Belliot G, Sosnovtsev SV, Chang KO, Green KY, Lloyd RE. Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *Journal of virology*. 2004;78(15):8172-82.
27. Green KY, Mory A, Fogg MH, Weisberg A, Belliot G, Wagner M, et al. Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells. *Journal of virology*. 2002;76(17):8582-95.
28. Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(7):515-28.
29. Terasawa K, Minami M, Minami Y. Constantly updated knowledge of Hsp90. *Journal of biochemistry*. 2005;137(4):443-7.
30. Marzec M, Eletto D, Argon Y. GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1823(3):774-87.
31. Altieri DC, Stein GS, Lian JB, Languino LR. TRAP-1, the mitochondrial Hsp90. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1823(3):767-73.
32. Te J, Jia L, Rogers J, Miller A, Hartson SD. Novel subunits of the mammalian Hsp90 signal transduction chaperone. *Journal of proteome research*. 2007;6(5):1963-73.
33. Li J, Soroka J, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1823(3):624-35.
34. Falsone SF, Leptihn S, Osterauer A, Haslbeck M, Buchner J. Oncogenic mutations reduce the stability of SRC kinase. *Journal of molecular biology*. 2004;344(1):281-91.
35. Geller R, Taguwa S, Frydman J. Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1823(3):698-706.
36. Connor JH, McKenzie MO, Parks GD, Lyles DS. Antiviral activity and RNA polymerase degradation following Hsp90 inhibition in a range of negative strand viruses. *Virology*. 2007;362(1):109-19.
37. Waxman L, Whitney M, Pollok BA, Kuo LC, Darke PL. Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(24):13931-5.

38. Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *Journal of virology*. 2005;79(8):4557-67.
39. Geller R, Vignuzzi M, Andino R, Frydman J. Evolutionary constraints on chaperone-mediated folding provide an antiviral approach refractory to development of drug resistance. *Genes & development*. 2007;21(2):195-205.
40. Vashist S, Urena L, Gonzalez-Hernandez MB, Choi J, de Rougemont A, Rocha-Pereira J, et al. Molecular chaperone hsp90 is a therapeutic target for noroviruses. *Journal of virology*. 2015;89(12):6352-63.
41. Alvarez-Sanchez C, Cancio-Lonches C, Mora-Heredia JE, Santos-Valencia JC, Barrera-Vazquez OS, Yocupicio-Monroy M, et al. Negative effect of heat shock on feline calicivirus release from infected cells is associated with the control of apoptosis. *Virus research*. 2015;198:44-52.
42. Powers MV, Workman P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocrine-related cancer*. 2006;13 Suppl 1:S125-35.
43. Evers DL, Chao CF, Zhang Z, Huang ES. 17-allylamino-17-(demethoxy)geldanamycin (17-AAG) is a potent and effective inhibitor of human cytomegalovirus replication in primary fibroblast cells. *Archives of virology*. 2012;157(10):1971-4.
44. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsiichlis P, Rosen N. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(42):39858-66.
45. Luo W, Sun W, Taldone T, Rodina A, Chiosis G. Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases. *Molecular neurodegeneration*. 2010;5:24.
46. Theodoraki MA, Caplan AJ. Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1823(3):683-8.
47. Hartson SD, Matts RL. Approaches for defining the Hsp90-dependent proteome. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1823(3):656-67.