

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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**“Papel de la proteína nucleolina en el ciclo replicativo
del calicivirus felino”**

TESIS

Que presenta

BEATRIZ ALVARADO HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR**

Directora de la Tesis:

DRA. ANA LORENA GUTIÉRREZ ESCOLANO

México, D.F.

DICIEMBRE, 2015

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 9 de Virología de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Director de Tesis

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano¹

Asesores

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Caceres¹

Dr. Jose Luis Rosales Encina¹

Dra. Rosaura Hernández Rivas²

Dra. Sofia Alcaráz Estrada³

Dr. Carlos Sandoval Jaime⁴

¹*Investigador titular del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN.*

²*Investigador titular del departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN*

³ *ISSSTE. Centro Médico Nacional 20 de Noviembre.*

⁴*Instituto de Biotecnología-UNAM*

Durante el desarrollo del trabajo, el autor conto con beca del Consejo
Nacional de Ciencia y Tecnología(CONACyT). 154767

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Ramón Alvarado Ochoa y Mercedes Hernández Villar, a mis hermanas Susana y Andrea; que, una vez más me brindaron su apoyo de mil formas lo cual desde siempre me ha permitido cumplir cada uno de mis sueños y metas. Gracias por estar conmigo siempre y sobre todo cuando más los he necesitado. A mi abuela Ofelia Ochoa†, que aunque ya no esta conmigo físicamente, sé que me ha acompañado y guiado hasta hoy en día.

A mi novio Julio Alcántara Montiel, que estuvo conmigo durante estos seis años apoyándome de manera incondicional, que me brindó su amor y que me escuchó, lo cual en conjunto fue muy importante para poder llegar al final de este recorrido.

A Mónica Graciela Mendoza, que me ha brindado su amistad, y que de nuevo me acompañó y que me apoyó incondicionalmente. A Eloy Pérez, por su amistad y apoyo. A Carlos Sandoval Jaime por su amistad y enseñanza invaluable durante el proyecto.

A la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, que me aceptó en su laboratorio, pero sobre por que me enseñó y formó con tanta dedicación y amor a lo que hacemos. Además, agradezco especialmente la confianza, amistad y apoyo incondicional en muchos aspectos, que tuve durante todo este tiempo.

A mi comité de asesores, Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Caceres, Dr. Jose Luis Rosales Encina, Dra. Rosaura Hernández Rivas, Dra. Sofia Alcaráz Estrada y al Dr. Carlos Sandoval Jaime; por los consejos, observaciones y el apoyo brindado durante el proyecto.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio: Juan Carlos, José Eduardo, Adrián, Martín y Oscar. En especial a Leidy C. Álvarez y a Eduardo López, por lo mucho que me enseñaron, pero sobre todo por haberme brindado su amistad y apoyo incondicional durante su permanencia en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos del CINVESTAV: Salomé, Ana Alcalá, Cinthia, Humberto, Fernando, Liliana, Antonio, Rebeca, Margot; por su amistad y apoyo en diferentes aspectos para el desarrollo del proyecto.

A los técnicos José Luis Chavarría Islas y Mario Rodríguez Nieves; así como al Q.B.P. Carlos Vázquez Calzada, Biól. Raúl Bonilla Moreno, Biól. Lidia Baylon Pacheco por su amistad y valioso apoyo técnico durante el desarrollo del proyecto.

ÍNDICE	Página
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
I. GASTROENTERITIS	14
II. NOROVIRUS HUMANOS	17
i. Enfermedad clínica y transmission	17
ii. Diversidad genética	17
iii. Patofisiología	18
iv. Sistemas de cultivo y modelos de estudio.	18
III. BIOLOGÍA DE LOS CALICIVIRUS	20
i. Estructura y organización del genoma	20
ii. Proteínas estructurales y no estructurales	21
iii. Ciclo replicativo de los calicivirus	25
1. Unión e internalización	25
2. Traducción del RNA viral	25
3. Replicación del RNA viral	26
4. Morfogénesis y salida	27
ANTECEDENTES	29
Nucleolina	31
Características de la proteína	31
Localización subcelular y función	33
ANTECEDENTES DIRECTOS	36
JUSTIFICACIÓN	38
HIPÓTESIS	38
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS PARTICULARES	38
MATERIALES Y MÉTODOS	39

-Cultivo celular y virus.	39
-Ensayo de inmunofluorescencia.	39
-Biotinilación de superficie celular.	40
-Detección de la NCL en la superficie de las células CrFK mediante citometría de flujo.	41
-Ensayo de unión de virus mediante citometría de flujo.	42
-Experimentos de inhibición.	43
-Clonación, expresión y purificación de la proteína recombinante Δ rNCL.	43
- Transfección estable de la proteína GFP- Δ rNCL en las células CrFK	45
- Transcripción <i>in vitro</i> .	45
- Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)	46
- Ensayos de traducción <i>in vitro</i> .	47
RESULTADOS	48
DISCUSIÓN	77
CONCLUSIONES	83
PERSPECTIVAS	83
BIBLIOGRAFÍA	84
ARTÍCULOS	99

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1.1 Causas de muerte en niños menores de 5 años.	14
Figura 1.2. Árbol filogenético de la familia <i>Caliciviridae</i> .	16
Figura 1.3. Organización genómica del HuNoV y del FCV.	21
Figura 1.4. Ciclo replicativo de los calicivirus.	28
Figura 1.5. Representación esquemática de la NCL y las modificaciones postraduccionales identificadas.	32
Figura 1.6. Distribución de la nucleolina en los diferentes compartimentos celulares y sus funciones.	35
Figura 1.7. Detección mediante inmunofluorescencia de la expresión de la nucleolina en las células CrFK.	50
Figura 1.8. Detección de los niveles de expresión de la nucleolina mediante citometría de flujo en las células CrFK.	50
Figura 1.9. Detección de la nucleolina en componentes membranosos de superficie de las células CrFK.	51
Figura 2.1. Detección de partículas de FCV en la superficie de las células CrFK.	53
Figure 2.2. El anticuerpo anti-NCL no inhibe la unión del FCV a las células CrFK.	54
Figura 2.3. El anticuerpo anti-NCL no tiene efecto sobre la infección de FCV en las células CrFK.	56
Figura 2.4. Clonación de la proteína truncada Δ -rNCL.	59
Figura 2.5. Expresión de la proteína truncada Δ -rNCL.	59
Figura 2.6. Purificación y Western-blot de la proteína truncada Δ -rNCL.	60
Figura 2.7. La NCL recombinante se une a la RT 5' y al 3' UTR del RNA del FCV.	62

Fig. 2.8. El AGRO100 inhibe la traducción <i>in vitro</i> de FCV.	66
Fig.2.9. AGRO100 interacciona específicamente con la NCL recombinante.	53
Fig. 3.0. La NCL completa pero no la NCL recombinante regula positivamente la traducción <i>in vitro</i> del FCV.	70
Fig. 3.2. Clonación de la NCL truncada en el vector pEGFP-C1(pEGFP-C1-r Δ NCL).	72
Fig. 3.3. La GFP- Δ rNCL genera disminución en la síntesis de proteínas virales y producción de partículas virales de FCV en las células CrFK.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>APP</i> b	Proteína precursora amiloide beta
A549	Línea celular de epitelio aéreo
BSA	Albumina de suero bovino
CPE	Efecto citopático
CMV	Citomegalovirus
CKII	Caseína Cinasa II
CrFK	Riñón de gato, cortex Normal
EMSA	Ensayo de super retardo electroforético
ETS	Secuencia de transcripción externa
FCV	Calicivirus Felino
FLrNCL	Nucleolina recombinante completa
Gn	Gnobotico
GFP	Proteína verde fluorescente
GRO	Oligodeoxinucleótido rico en guaninas
G418	Geneticina
GST	Glutathion S-transferasa
GAR	Rico en Glicina y Arginina
HBGA	Antígenos de histogrupos sanguíneos
hnRNP-L	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear L
HuCVs	Calicivirus Humano
HuNoVs	Norovirus Humano
Hsp70	Proteína de choque térmico 70
HPIV-3	Virus de la parainfluenza tipo 3
HRV	Rinovirus humano
hnRNP A1	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1
<i>HBB</i>	b-globina
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus.
<i>IL2</i>	Interleucina 2
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
JAM-1	Molécula de adhesión celular 1
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LC	Líder de la Cápside
MNV	Norovirus Murino
MV4-11	Línea celular, macrófagos de sangre periférica
MOI	Multiplicidad de Infección
NCL	Nucleolina
NV	Virus Norwalk
NoV	Norovirus
NSP	Proteína no estructural
NS	No estructural
NRE	Elemento de reconocimiento de la nucleolina
ORF	Marco de lectura abierto
P	Protruding
PoSaV	Sapovirus Porcino
PTB	Proteína del tracto de polipirimidinas
PCBP	Proteína de unión al tracto de poly C
PABP	Proteína de unión al tracto de poly A

PBS	Buffer de fosfatos
<i>PGHS1</i>	Prostaglandina endoperoxidasa H
PV	Poliovirus
RNA	Ácido Ribonucleico
RRL	Lisado de Reticulocitos de Conejo
RNT	Region No Traducida
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RBD	Dominio de union a RNA
RE	Reticulo Endoplásmico
RRM	Motivo de union a RNA
RNP	Ribonucleoproteico
RSV	Virus Sincitial Respiratorio
RPL26	Proteína ribosomal L26
RC	Complejos replicativos
S	Shell
SNARE	Proteina receptora de unión al NSF soluble
SLN	Señal de Localización Nuclear
siRNA	RNA de interferencia
SL	Tallo burbuja
VAP-A	Membranas asociadas a vesículas de la proteína A
DrNCL	Nucleolina recombinante deletada en el amino
1HAEo-	Linea celular de epitelio de vías respiratorias

RESUMEN

El calicivirus felino (FCV) representa uno de los modelos más importantes para el estudio de la biología de los calicivirus. Como con otros virus de RNA de cadena sencilla polaridad positiva, los calicivirus requieren de componentes celulares durante su ciclo replicativo. En nuestro laboratorio se demostró que la nucleolina (NCL), una fosfoproteína que participa en la biogénesis del ribosoma, proliferación, regulación del ciclo celular y en diferentes etapas del ciclo replicativo de algunos virus, se asocia con el genoma del virus Norwalk y del FCV. El silenciamiento de la NCL en las células CrFK usando siRNA, generó una reducción en la síntesis proteica y producción viral del FCV, demostrando que juega un papel en el ciclo replicativo del FCV. En este trabajo, analizamos el papel específico de la NCL en el ciclo replicativo del FCV. Determinamos mediante ensayos de inhibición con anticuerpos y NCL soluble, que ésta no participa en la unión y entrada del FCV a las células CrFK. Por otro lado, mediante ensayos de movilidad electroforética (EMSA), demostramos que la NCL se une específicamente a las regiones terminales 5' y 3' del genoma del FCV, así como al AGRO100, un aptámero que se une específicamente a la NCL. Concentraciones crecientes de AGRO100 inhibieron la formación del complejo entre la NCL y el RNA viral de manera dependiente de dosis, confirmando su interacción. Para determinar si la NCL participa en la síntesis de proteínas del FCV, realizamos ensayos de traducción *in vitro* usando el lisado de reticulocitos de conejo (RRL). La síntesis de proteínas del genoma de FCV se redujo de manera dependiente de dosis cuando se incrementaron las concentraciones de AGRO100, sugiriendo que la NCL tiene un papel en la traducción del RNA de FCV. Además, la adición de la NCL completa (FLrNCL) pero no de la NCL deletada en la región amino-terminal (DrNCL), permitió la recuperación de la síntesis proteica, sugiriendo de esta manera un papel importante para el dominio N-terminal de la NCL en la traducción viral. Todos estos resultados en conjunto indican que la NCL regula positivamente la traducción *in vitro* del RNA de FCV.

ABSTRACT

Feline calicivirus (FCV) represent one of the most important models for the study of calicivirus biology. As other positive strand RNA viruses, caliciviruses require host cellular components at different steps along their viral life cycle. We have previously determined that nucleolin (NCL), a nucleolar phosphoprotein involved in ribosome biogenesis, proliferation, cellular cycle regulation, and in several steps of the replicative cycle of other viruses, is associated with the Norwalk virus (NV), and FCV genomes. NCL knockdown in CrFK cells by siRNA assays causes a reduction of viral protein synthesis and virus yield production, demonstrating its role in FCV life cycle. The aim of this work was to determine the specific role of NCL in FCV replicative cycle. We determined by inhibition experiments with antibodies and soluble protein that NCL does not participate in the binding or entry of FCV to CrFK cells. On the other hand by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) we demonstrated that NCL specifically binds to both 5' and 3' ends of the FCV genomic RNA, as well as to AGRO100, an aptamer that specifically bind to NCL. Increasing amounts of AGRO 100 inhibited the complex formation between NCL and the viral RNA in a dose dependent manner, confirming the interaction between AGRO100 and NCL. To determine if NCL participates in FCV protein synthesis, we performed *in vitro* translation assays using rabbit reticulocyte lysates (RRL). Protein synthesis directed by FCV genomic RNA was reduced in a dose dependent manner when increasing concentrations of AGRO100 were added to the reaction, suggesting that NCL has a role in FCV translation. Moreover, the addition of the FLrNCL but not DrNCL allowed recovering of FCV viral protein synthesis, suggesting the role of the N-terminal end of NCL in viral translation. All these results indicate that NCL positively regulates FCV RNA *in vitro* translation.

PAPEL DE LA PROTEÍNA NUCLEOLINA EN EL CICLO REPLICATIVO DEL CALICIVIRUS FELINO

INTRODUCCIÓN

I. GASTROENTERITIS

La gastroenteritis, cuyo síntoma principal es la diarrea, es una de las causas más frecuentes de mortalidad en neonatos y niños menores de 5 años, generando alrededor de 2,195 muertes diariamente (**Fig. 1.1**)^{1,6,7}.

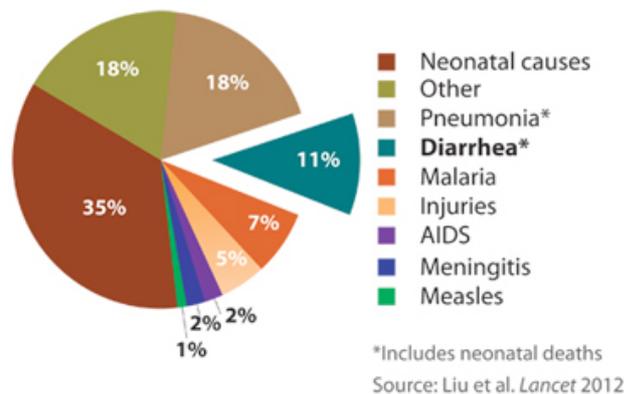


Figura 1.1 Causas de muerte en niños menores de 5 años. La diarrea, es la tercer causa de muertes en niños menores de 5 años¹.

Los agentes infecciosos causantes de gastroenteritis, incluyen una gran variedad de parásitos, bacterias y virus^{8,9}. Particularmente, la gastroenteritis viral representa un grave problema de salud pública, ya que ocurre en dos distintos patrones epidemiológicos: endémico y epidémico¹⁰.

Los calicivirus afectan a todos los vertebrados y causan una gran variedad de enfermedades en ellos^{11,12}. De acuerdo al comité internacional de taxonomía de virus (ICTV), los calicivirus comprenden cinco géneros: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Vesivirus*, *Lagovirus* y *Nabovirus/Becovirus*² (**Fig. 1.2**); los que infectan a humanos, denominados calicivirus humanos (HuCVs) comprenden únicamente algunos virus pertenecientes a los géneros *Norovirus* y *Sapovirus*¹³, los cuales

son actualmente reconocidos como la causa más importante de brotes de gastroenteritis en todo el mundo¹⁴.

Los sapovirus son causantes de gastroenteritis, pero rara vez causan epidemia y endemia como los norovirus humanos (HuNoVs)^{15,16}. Se estima que cada año los HuNoVs son causantes de aproximadamente 64,000,000 episodios de diarrea y 900,000 visitas clínicas en los países industrializados y más de 200,000 muertes en niños menores de 5 años en países en vías de desarrollo⁶.

El Virus Norwalk, es el prototipo de los HuNoVs, y es considerado como uno de los agentes etiológicos más importantes de gastroenteritis epidémica en niños y adultos. Fue el primer virus en haber sido identificado como agente causal de gastroenteritis en humanos y fue observado en 1972 por primera vez mediante inmunomicroscopía electrónica, en un filtrado de heces de pacientes infectados durante un brote de gastroenteritis ocurrido en una escuela primaria en Norwalk, Ohio¹⁷. En México aún no se ha determinado con exactitud el papel que juegan los HuNoVs en la generación de las enfermedades diarreicas. Sin embargo, estudios de seroprevalencia, han permitido establecer que la población mexicana está expuesta a estos patógenos desde muy temprana edad¹⁸. Además, en México se ha determinado que los HuNoVs, son los responsables de casos de hospitalización por gastroenteritis en niños menores de 5 años¹⁹ y que contribuyen a incrementar la severidad de los cuadros diarreicos causados por otros patógenos²⁰.

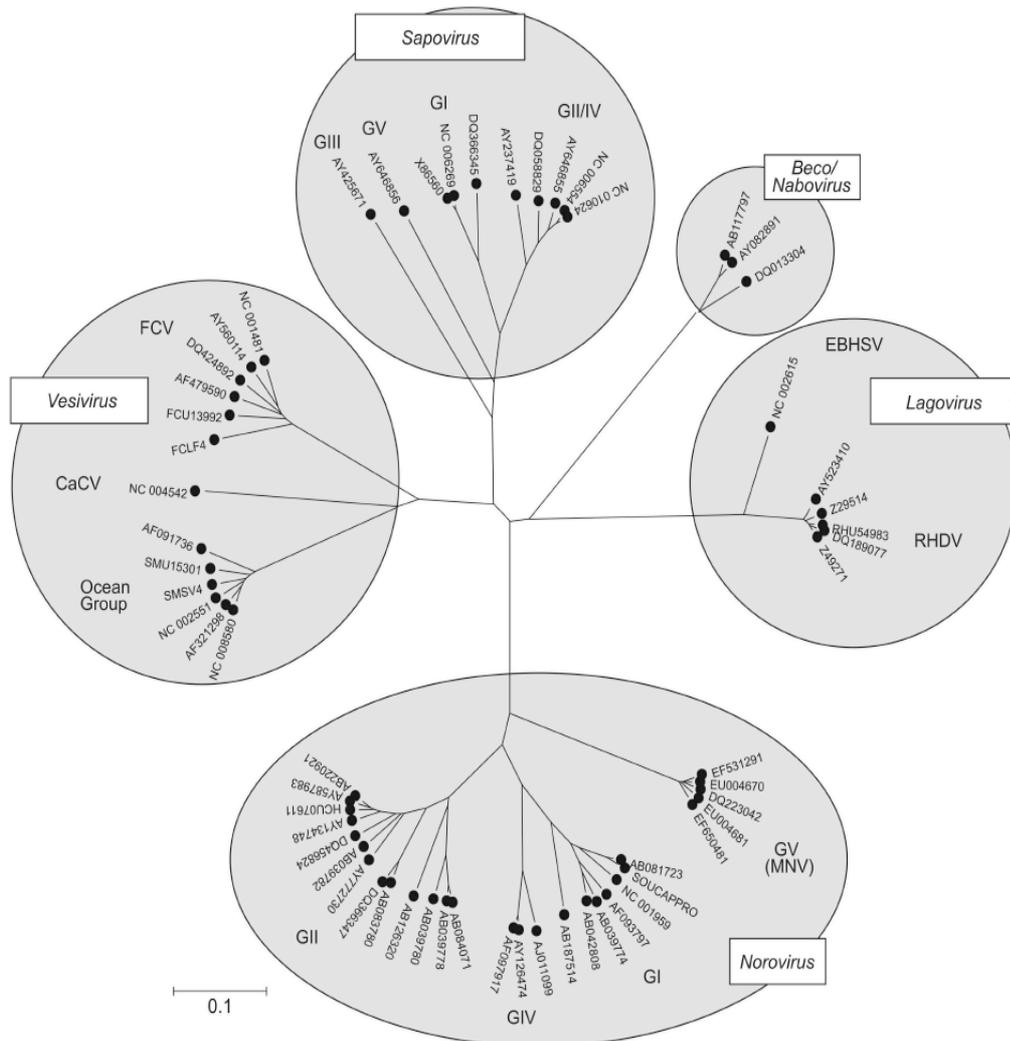


Figura 1.2. Árbol filogenético de la familia *Caliciviridae*. Realizado con base en la región que codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA de variantes representativas de cada género².

II. NOROVIRUS HUMANOS

i. Enfermedad clínica y transmisión.

En los adultos inmunocompetentes, el curso de la infección por HuNoVs es rápido, con un periodo de incubación de 24 a 48 horas y una resolución de los síntomas de 17 a 72 horas²¹. Los síntomas incluyen vómito y diarrea con o sin náuseas y peristaltismo doloroso²². Sin embargo en los lactantes y los niños pequeños, así como en los adultos mayores e individuos inmunosuprimidos, el cuadro de gastroenteritis es más grave, ya que genera síntomas que pueden durar desde seis semanas hasta más de dos años²³⁻²⁵. Además, se han asociado con distintos cuadros como encefalopatías y enterocolitis necrozante en neonatos²⁶⁻²⁸.

La ruta de infección por HuNoVs es oro-fecal, a través del consumo de agua y alimentos contaminados o por contacto con superficies contaminadas. La infección se propaga por contacto entre personas o por el aire, a partir de fómites y por la aerosolización de vómitos^{8,29}, lo cual podría explicar la propagación rápida y extensa, generando brotes en lugares cerrados como hospitales, hoteles, cruceros y guarderías³⁰⁻³⁵.

ii. Diversidad genética.

Un aspecto interesante de los HuNoVs es la diversidad genética, el género *Norovirus* se clasifica en 5 genogrupos (GI-GV) y en 32 genotipos con base en la secuencia completa de la proteína VP1 de la cápside (**Fig. 1.2**), de los cuales, los genogrupos GI, GII y GIV son los que infectan a humanos³⁶. Poseen un alto grado de variabilidad genética, que puede diferir entre el 45 al 61% entre genogrupos, del 14 al 44% entre los miembros de un genotipo, y de 0 al 14% dentro de un mismo genotipo. Esta gran variabilidad, es sin duda uno de los factores que impide que se induzca una inmunidad que proteja contra varios genogrupos².

iii. Patofisiología.

Debido a la falta de un sistema de cultivo celular y modelos animales para su propagación e infección, el conocimiento que se ha adquirido sobre la patogénesis de los NoVs, ha sido en gran parte por los estudios realizados en voluntarios humanos infectados ³⁷.

Se ha observado que tras la infección, se presenta inflamación de la mucosa, anomalías en la absorción celular, acortamiento de las vellosidades de los enterocitos, hipertrofia de las criptas, aumento de la mitosis de las células epiteliales, disfunción de la barrera epitelial y apoptosis epitelial, la cual en parte podría estar mediada por un aumento en la infiltración de linfocitos intraepiteliales citotóxicos ^{37,38}. Diversos estudios *in vivo* sugieren que los NoV causan apoptosis de enterocitos humanos ³⁷, de cerdos ^{39,40} y de ratones ⁴¹; aunque aún no está claro si la infección viral de enterocitos induce directamente apoptosis o si un componente secretado de otras células actúa sobre los enterocitos generando dicho evento.

iv. Sistemas de cultivo y modelos de estudio.

Numerosos esfuerzos se han realizado para poder propagar a los NoVs en cultivos celulares ⁴². Aunque los NoVs han podido propagarse en modelos animales, como el Macaco Rhesus, el Macaco Cola de Cerdo y el Chimpancé, el éxito de la infección como de la enfermedad clínica ha sido limitada en comparación a lo que se observa en el humano ^{43,44}. El modelo más prometedor hasta el momento ha sido el cerdo Gnobiótico (Gn), pero aún está bajo desarrollo e investigación ^{39,45,46}.

Actualmente se cuenta con un sistema de cultivo *in vitro* para poder estudiar la biología de los HuNoVs, que consiste en un cultivo de células B, cuya infección se permite por la coinfección con bacterias entéricas que expresan en su superficie los antígenos del grupo sanguíneo (HBGA) ⁴⁷. Dada la incapacidad hasta hace poco tiempo, para propagar a los HuNoVs *in vitro*, se han usado modelos subrogados, los cuales, son otros miembros de la familia *Caliciviridae*

como el calicivirus felino (FCV), el sapovirus porcino (PoSaV) y el norovirus murino (MNV), de los cuales se cuenta con sistema de cultivo celular y modelo animal ⁴⁸⁻⁵⁰.

Aunque el MNV se replica de manera eficiente en cultivos primarios o inmortalizados de células dendríticas y macrófagos ⁵¹, también se ha desarrollado un gran número de sistemas de genética reversa, que en conjunto han permitido conocer un poco más sobre la biología de los calicivirus ⁵²⁻⁵⁵.

A pesar de las diferencias en la patogénesis causada por el FCV y los NoVs, el FCV comparte una organización genómica semejante a la de los HuNoVs; aunado a ello, el FCV fue el primer calicivirus para el cual se desarrolló un sistema de genética reversa ⁵⁶, haciéndolo un modelo atractivo para el estudio de los mecanismos moleculares de la traducción y replicación del genoma de los calicivirus. Con este modelo se demostró que el complejo eIF4F se requiere para una eficiente traducción del RNA del FCV; que la infección de FCV promueve la inhibición de la síntesis de proteínas celulares las cuales se cree que podrían estar asociadas al corte de factores del inicio de la traducción ^{57,58}. Con el modelo de FCV, el cual se replica de manera muy eficiente en la línea celular de fibroblastos de riñón de gato (CrFK, *Felis catus* kidney, cortex Normal), se descubrió por primera vez un receptor de los calicivirus (JAM-1) y un factor celular (la proteína de unión al tracto de polipirimidina, PTB) que interacciona con el genoma viral ⁵⁹⁻⁶¹.

III. BIOLOGÍA DE LOS CALICIVIRUS

i. Estructura y organización del genoma

El virión del FCV es de aproximadamente 35 nm de diámetro, sin envoltura y con estructura icosaédrica ⁶². La cápside esta formada por las proteínas estructurales, VP1 y VP2 ^{63,64}. El genoma, es una molécula de RNA de cadena sencilla y de polaridad positiva con un tamaño de ~7.6 Kb, el cual tiene unida covalentemente en el extremo 5' a la proteína viral VPg; y en el extremo 3' se encuentra poliadenilado (**Fig. 1.3**) ^{63,65}.

Por otro lado, el RNA viral posee regiones regulatorias en ambos extremos terminales, que forman estructuras de RNA en forma de tallo y burbuja (SL, por sus siglas en inglés Stem Loop) que actúan en cis- y que generalmente se encuentran en las regiones no traducidas (RNT) ⁶⁶. Las RNTs cuales son generalmente cortas, por ejemplo las RNT 5' y 3' del FCV tienen un tamaño de 20 y 46 nts respectivamente y la RNT 3' de HuNoV es de alrededor de 48 nt ^{67,68}. Por ello, muchas veces estas estructuras regulatorias se extienden a regiones vecinas que son codificantes ².

El genoma viral esta organizado en tres marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés Open Reading Frame). El ORF 1, localizado en la región 5' proximal del RNA genómico viral, codifica a una poliproteína que es procesada por la proteasa viral y da origen a siete proteínas no estructurales (NSP, por sus siglas en ingles non structural proteins) ^{69,70}; mientras que en la región proximal 3' se encuentran los ORF 2 y 3, los cuales codifican a las proteínas estructurales, mayoritaria (VP1) y minoritaria (VP2) de la cápside, a partir de un RNA subgenómico de un tamaño de ~2.4 Kb, el cual en el extremo 5' tiene también unida covalentemente a la proteína viral VPg y en el extremo 3' se encuentra poliadenilado, así como el RNA genómico (**Fig. 1.3**) ^{70,71}.

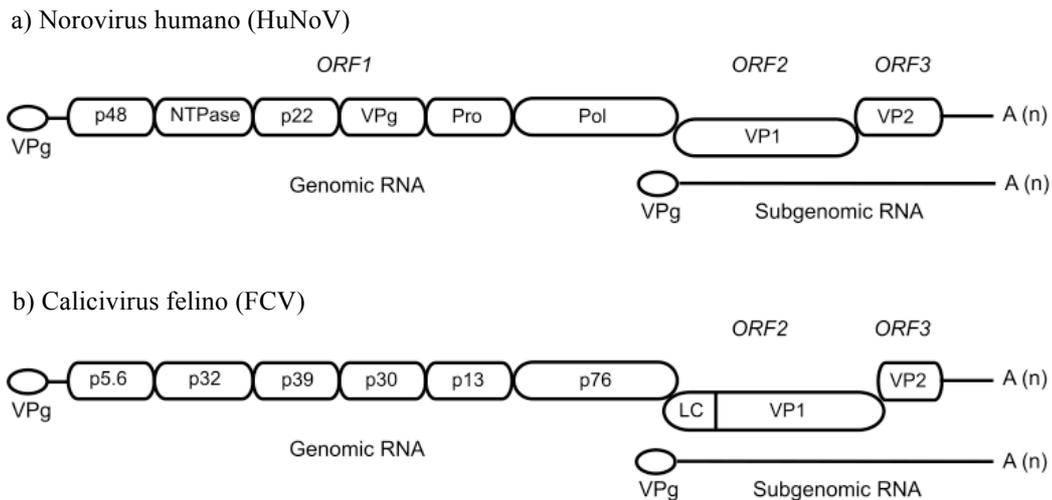


Figura 1.3. Organización genómica del HuNoV y del FCV. Los genomas están organizados en 3 ORFs. El RNA subgenómico está organizado en 2 ORFs. La proteína VPg unida covalentemente al extremo 5' y el extremo 3' está poliadenilado. El ORF1 codifica para las NSP, mientras que el ORF 2 y 3, codifican para las proteínas estructurales VP1 y VP2 respectivamente. Organización del genoma de (a) HuNoV y de (b)FCV. Además el FCV da origen a un péptido denominado LC que es codificado en el extremo 5' de la VP1. Modificado de ⁴.

ii. Proteínas estructurales y no estructurales.

El ORF1 es traducido como una poliproteína, la cual es co- y post-traduccionalmente procesada por una proteasa codificada por el mismo virus (NS6) para dar origen a seis NSP incluyendo a las NS1, NS2, NS3 o NTPasa/RNA helicasa, NS4, NS5 o Vpg y NS6/7 o proteasa-polimerasa⁷²⁻⁷⁵. Finalmente las proteínas estructurales, VP1 y VP2 codificadas por el ORF 2 y 3 respectivamente, a partir del RNA subgenómico, y son las que conforman la cápside del virión^{53,54}.

1. NS1-NS2

Es la primera proteína codificada por el ORF1, denominada también proteína “N-terminal”. Durante la replicación del FCV, esta proteína es eficientemente procesada para dar origen a las proteínas maduras NS1 (5.6 kDa) y NS2 (32 kDa), pero en los HuNoVs, estas son expresadas como una proteína precursora estable NS1-2. Mediante ensayos de transfección transitoria, de la

NS1-2 de HuNoVs se demostró que interactúa con membranas y con la proteína celular VAP-A, la cual está involucrada en el transporte celular RE/Golgi ^{76,77} .

2. NS3 (NTPasa)

Mediante el análisis de la secuencia de la proteína NS3, se sugiere que ésta codifica para una helicasa viral ^{78,79}. Estudios bioquímicos han demostrado que se une a los NTPs y que posee actividad de NTPasa ^{80,81}, aunque no hay evidencia experimental de que pueda desdoblarse un RNA dúplex. En las células RAW264.7, las cuales son permisivas a la infección por MNV, se demostró, mediante la transfección transitoria de la NS3, que ésta induce rearrreglos membranales, muy similares a los que se observan en la infección ⁶⁸. Estos hallazgos sugieren que juega un papel central en la formación de complejos replicativos ⁶⁸. Mediante ensayos de doble-híbrido se demostró que la NS3 interactúa con la NS2 ⁸², por lo que podría estar participando como una proteína de andamiaje para la formación de los complejos replicativos.

3. NS4

Se sugiere que la NS4 podría bloquear la secreción de proteínas celulares para impedir el bloqueo del tráfico RE-a-Golgi como la proteína 3A de poliovirus ^{83,84}. Además se ha demostrado que la NS4 es el precursor de la NS4-NS5 (VPg), posiblemente asistiendo a la VPg en la síntesis de RNA en los complejos replicativos ^{69,72}.

4. NS5 (VPg)

La NS5 es una proteína pequeña (13-15 kDa) que se encuentra unida al genoma viral en el extremo 5' (VPg) ⁸⁵. Está involucrada en tres procesos muy importantes del ciclo replicativo de los calicivirus: replicación, traducción y empaquetamiento. La VPg juega un papel indispensable en el inicio de la traducción del genoma viral, ya que el RNA extraído de viriones purificados son menos infecciosos de manera significativa si son tratados con proteinasa K ^{65,86,87}; además, otros estudios han demostrado que la VPg interactúa con diferentes factores del inicio de la traducción ^{57,88-90}. Su dependencia por estos la hace ser descrita como un cap proteináceo, que en el caso del FCV actúa para reclutar el

complejo de pre iniciación. Estudios *in vitro* han demostrado que la VPg es nucleotidilada por la polimerasa viral⁹¹⁻⁹³ y que ésta modificación es esencial para la replicación viral, ya que la VPg nucleotidilada sirve como primer para la síntesis del genoma viral como en los picornavirus⁹⁴. El papel de ésta proteína en el empaquetamiento aún no ha sido determinada, pero se sabe que el genoma unido a la proteína VPg es esencial para la producción de virus infecciosos⁶⁵.

5. NS6 y NS7 (proteasa y polimerasa)

La NS6 (proteasa quimi tripsina-like) y la NS7 (RNA polimerasa dependiente de RNA), son las proteínas virales que han sido más estudiadas y caracterizadas. A nivel de secuencia, la NS6 posee homología con la proteasa 3C de los picornavirus^{95,96}. Además, mediante estudios de mutagénesis^{95,97,98} y de inhibición de la actividad de proteasas^{97,101,102} se confirmó que la proteasa de los calicivirus contienen un sitio activo de cisteína, similar a la proteasa de los picornavirus. Se sabe que la proteasa viral NS6 por sí misma tiene la capacidad de cortar el ORF1^{91,103-106} ^{69,72}.

La NS7 o RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), posee homología significativa con la RdRp de los picornavirus^{79,107}, además juega un papel importante en la replicación del genoma viral y en la producción del RNA subgenómico. Mediante la expresión de diferentes formas recombinantes de la NS7 se ha determinado su actividad en la síntesis de RNA y su dependencia de templado para ello¹⁰⁷⁻¹¹¹.

Aunque en la mayoría de los calicivirus ambas proteínas se procesan y actúan de manera independiente, en el caso de los vesivirus, y específicamente para el FCV, la NS6/7 es una proteína única que no se procesa y que posee actividad tanto de proteasa como de RdRP. Las implicaciones de este hecho en el establecimiento de la infección aún son poco conocidas.

Proteínas estructurales:

6. VP1 (proteína mayor de la cápside)

La VP1 es la proteína mayoritaria de la cápside, cuya principal función es el empaquetamiento del genoma. Esta proteína se divide en dos dominios: un dominio denominado *shell* (S), y otro denominado *protruding* (P) que a su vez se

subdivide en P1 y la región hipervariable P2¹¹². La VP1 forma dímeros estables, y 90 dímeros que interactúan para formar a la partícula viral. El dominio S forma una estructura icosaédrica tipo esfera T=3 en los cuales el RNA es empaquetado. El dominio P interactúa como dímeros formando proyecciones que se unen a su receptor funcional y a sus factores de adhesión^{60,113}.

La proteína VP1 se sintetiza como un precursor que es procesado de inmediato para dar origen a la proteína VP1 madura, capaz de autoensamblarse y formar las cápsides virales. El extremo amino terminal, escindido del precursor, da origen a una proteína conocida como líder de la cápside o LC, de tan solo 124 aminoácidos. Es una proteína única en el género *Vesivirus* y es indispensable para la recuperación de virus infecciosos. Mediante ensayos de transfección transitoria de la proteína LC de FCV en las células CrFK, se observó que por sí misma genera un efecto citopático semejante al observado en las células infectadas con el FCV^{70,102,114} y que además, es esencial para la producción de virus infecciosos. Se ha reportado que la LC promueve la replicación del RNA del replicón del virus Norwalk¹¹⁵, lo cual se asocia con un incremento en los niveles del RNAm del receptor de la lipoproteína de baja densidad¹¹⁶; sin embargo aún se desconoce el mecanismo. También se ha propuesto que la LC podría funcionar como una proteína no estructural, porque no se detecta en los viriones de FCV purificados¹¹⁷.

7. VP2 (proteína menor de la cápside)

La proteína VP2 es la proteína menor de la cápside, de la cual son generadas pocas copias, de 1 a 10^{64,118-120}. Su función aún no se ha descrito, sin embargo se cree que su posible papel es la de darle estabilidad a la proteína VP1¹²¹, aunque la VP1 sola, es suficiente para el auto ensamble de las partículas virus-like. Debido a la naturaleza básica de la VP2, se ha propuesto que estabiliza el RNA viral durante el ensamble de las partículas infecciosas^{71,112,120}.

iii. Ciclo replicativo de los calicivirus

1. Unión e internalización.

Poco se ha estudiado sobre la entrada de los calicivirus a la célula blanco; sin embargo para el FCV se ha reportado que el alfa-2,6 ácido siálico y la molécula de adhesión celular 1 (JAM-1) son los receptores de unión y entrada ^{59,122}. La proteína JAM-1 se une a la cara exterior del capsómero, induciendo un cambio conformacional en la cápside que podría ser importante para la desencapsidación vírica ^{59,122-124}. Después de la interacción virus-receptor (**Fig. 1.4**), ocurre la endocitosis dependiente de clatrina y finalmente mediante la acidificación de los endosomas se permite la liberación del genoma al citoplasma ¹²⁵.

2. Traducción del RNA viral.

Después de que el RNA genómico es liberado al citoplasma celular, VPg-RNA funciona como un RNAm celular, a partir del cual se sintetizan inmediatamente las NSP (**Fig. 1.4**). Este evento sucede porque la proteína VPg viral actúa como un sustituto de cap y permite el reclutamiento de la maquinaria traduccional como el eIF4E, eIF3, eIF4A y eIF4F, para comenzar con las primeras rondas de traducción ^{57,88-90}. Aunque se ha sugerido que en el inicio de la traducción también deben participar factores no canónicos de la traducción ¹²⁶. El ORF1, da origen a una poliproteína que libera intermediarios y formas maduras de las proteínas virales al citoplasma (**Fig. 1.4**) ^{100,102,109}. La traducción de las proteínas estructurales VP1 y VP2 ocurre a partir del VPg-RNA subgenómico (**Fig. 1.4**). Ésta, es una estrategia que le permite al virus producir altos niveles de la proteína VP1 en etapas tardías de la infección, para el ensamble, asegurando la presencia del RNA genómico viral ⁶³. La traducción de la VP2 ocurre por un mecanismo de termino-reinicio, es decir después de que los ribosomas terminan la traducción del ORF2 (VP1) se asocian de inmediato al RNA subgenómico para reiniciar la traducción del ORF3 (VP2) ⁹⁹.

Un dato adicional muy interesante es que la presencia de proteínas virales se relaciona con un abatimiento de la síntesis de *novo* de proteínas celulares, lo que trae como consecuencia que los componentes de esta maquinaria traduccional sean utilizados para la producción preferencial de las proteínas virales ⁵⁷.

3. Replicación del RNA viral.

Después de la acumulación de proteínas no estructurales virales en el citoplasma celular, se da paso a los mecanismos que permiten la síntesis del RNA que constituirá el genoma de la progenie viral. Éste evento inicia con el establecimiento de complejos replicativos (RC, por sus siglas en inglés replicative complexes), que son definidos como rearrreglos membranosos de los orgánulos celulares (**Fig. 1.4**)^{127,128}; los cuales son enzimáticamente activos, y pueden ser aislados de células infectadas¹²⁹. Se demostró que la expresión transitoria de las proteínas NS2, NS3, y NS4 generan la colocalización de éstas proteínas en el retículo endoplásmico (RE) y que además por sí solas pueden reestructurar el RE⁷⁵, sugiriendo de esta manera que el RE podría ser un recurso para la formación de los RCs. La replicación del VPg-RNA ocurre dentro de estos RCs y se sugiere involucra varios pasos. De manera similar a otros virus el FCV genera grandes cantidades de genomas de RNA de cadena sencilla polaridad positiva, vía el intermediario de polaridad negativa^{130,131}. Estudios reportan que la VPg además de participar en la traducción de las proteínas virales, también podría estar cumpliendo la función de *primer* o iniciador para la RNA polimerasa dependiente de RNA y de ésta manera promover la síntesis del RNA de cadena negativa (**Fig. 1.4**)^{93,132}. También se reportó que la actividad de la RdRp es potenciada por su interacción directa con el dominio shell de la VP1, dependiente de la concentración de ésta última y además especie específica^{82,133}. Estos hallazgos fueron obtenidos usando el sistema denominado “NoV-5BR assay” en el que, en las células se co-expresan las proteínas virales NS7 y VPg, y la síntesis de RNA *de novo* se mide de manera indirecta, a través del censo celular mediado por RIG-I por la producción de RNA 5'-trifosforilado, producido por la NS7 quien usa como templado algunos RNAs celulares, los cuales generan subsecuentemente la activación del promotor de IFN- β unido a la luciferasa¹³⁴.

Respecto a la síntesis del RNA subgenómico, aún no es muy claro, sin embargo actualmente existen dos modelos propuestos:

a) TERMINACIÓN PREMATURA: propone que durante la síntesis del RNA de cadena negativa, la polimerasa termina en una región que se encuentra río arriba del codón de inicio del ORF2, produciendo un RNA subgenómico de polaridad

negativa, el cual a su vez servirá para dar origen a otro de cadena positiva y que finalmente servirá para originar a las proteínas estructurales mayoritaria o VP1 y minoritaria o VP2 de la cápside ¹³⁵.

b) INICIO INTERNO: propone que la RNA polimerasa dependiente de RNA se une a una secuencia promotora en el RNA de cadena negativa, que se encuentra arriba del codón de inicio del ORF2 y a partir de la cual se genera un RNA subgenómico de cadena positiva el cual servirá para dar origen a las proteínas estructurales del virus durante la ronda de traducción tardía ¹³⁶.

4. Morfogénesis y salida.

La expresión de VP1 es independiente de otros componentes virales, y como se ha observado en estudios *in vitro*, es capaz de auto-ensamblarse para formar las cápsides ^{137,138}. Estudios de cristalografía demuestran que la cápside, formada por 90 dímeros de VP1 y de 1 a 10 copias de la VP2, es muy hermética y no presenta orificios de tamaños apropiados, por lo que se ha deducido que la encapsidación del RNA ocurre de forma simultánea a la traducción de las proteínas VP1 y VP2, en concordancia con el hecho de que el RNA genómico viral está sintetizándose a la par de la traducción de VP1 y VP2. Aún no está claro como ocurre el empaquetamiento pero se cree que depende de la proteína VPg, ya que una proporción significativa de viriones son empaquetados con RNA subgenómico, cuyos viriones no son infecciosos ¹³⁹. Una vez formadas las partículas virales, éstas son liberadas al medio, tras la lisis de las células infectadas ^{140,141}. Aunque la cápside viral se encuentra formada casi en su totalidad por la proteína VP1, se ha reportado que la proteína VP2 es indispensable para una replicación eficiente ¹⁴². El último paso del ciclo de vida es la liberación de los virus ensamblados y de esta manera propagar los virus infecciosos. Como virus citopático no envuelto, FCV es liberado mediante lisis celular. Particularmente con FCV, diversos estudios han determinado que la apoptosis es inducida durante la replicación viral ¹⁴³⁻¹⁴⁵ proveyendo al menos un mecanismo por el cual la membrana plasmática de las células es permeabilizada para permitir la liberación de las nuevas partículas formadas.

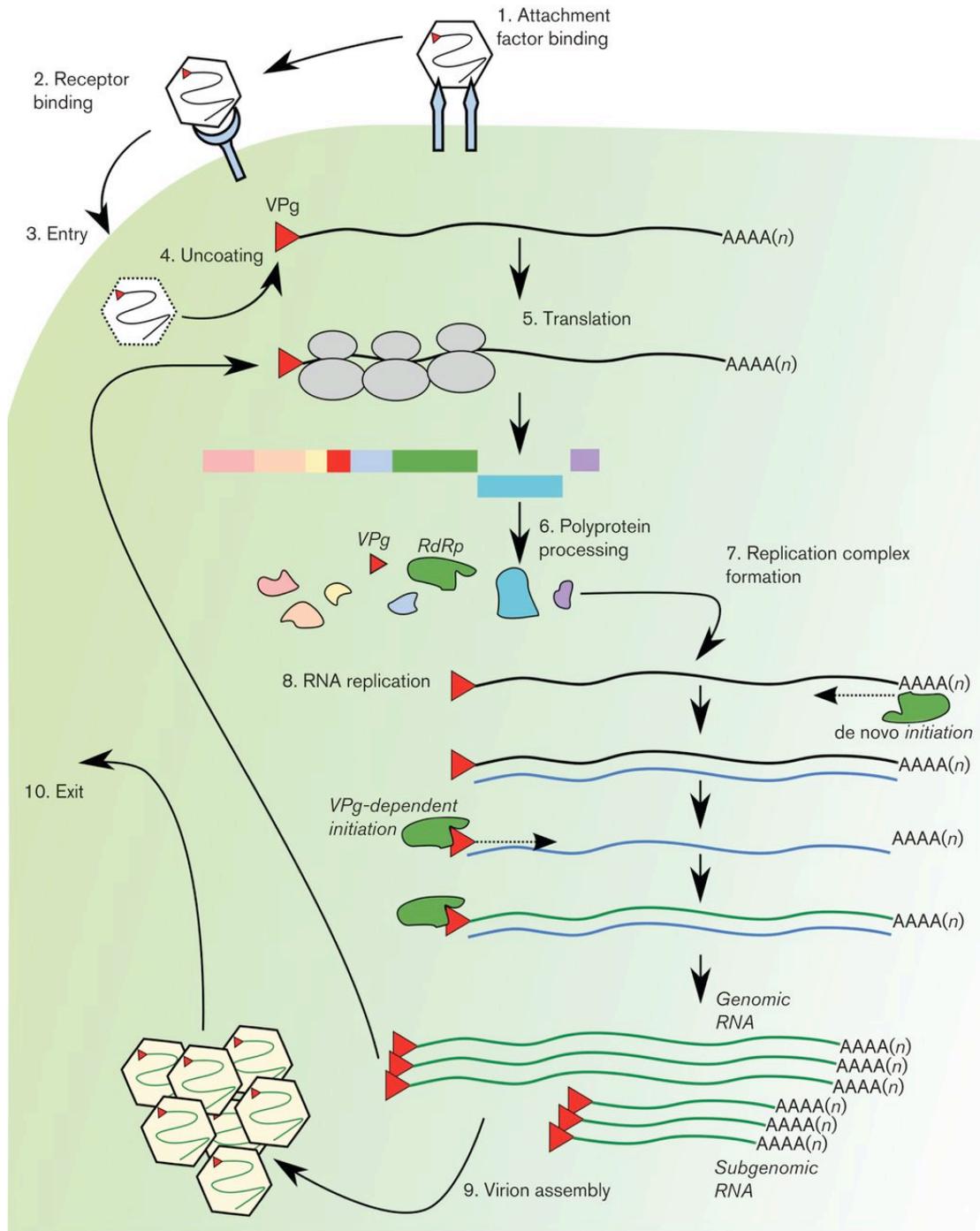


Figura 1.4. Ciclo replicativo de los calicivirus. El virión se une a la superficie usando carbohidratos como factores de adhesión (1). Posteriormente se une a su receptor de unión (2). Ocurre la entrada (3) y el desensamble (4). El genoma viral es traducido a través de la interacción de factores de la traducción celulares a la VPg (triángulo rojo) (5). El ORF1 es traducido a una poliproteína co- y post-traduccionalmente procesada por la NS6 (6). Los RCs se forman por el reclutamiento de membranas celulares (7). La replicación del RNA se genera a partir de un intermediario de cadena negativa, a partir del cual también se genera el RNA subgenómico, cuyo proceso es llevado a cabo por la NS7 o RdRp, usando el mecanismo dependiente de VPg (8). Los genomas son traducidos dentro de los RCs o empaquetados en la cápside (9) para la formación del virión y su posterior salida (10).⁵

ANTECEDENTES

Participación de las proteínas celulares en el ciclo replicativo de los calicivirus.

Como parásitos intracelulares obligados, los virus requieren de la maquinaria celular hospedera. Se ha demostrado que las proteínas celulares de la célula hospedera, así como sus vías de señalización son esenciales para que se lleve a cabo una replicación productiva en todos los virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva ¹⁴⁶. Particularmente las proteínas celulares son un factor determinante para que se lleve a cabo una infección por virus, sobre todo para el tropismo viral, ya que sus niveles de expresión relativos pueden determinar la eficiencia con que un virus puede replicarse en un tejido en particular y como consecuencia causar la enfermedad.

Los virus de RNA, a través de la expresión de sus propias proteínas usan a los organelos celulares como base para establecer sus RCs, promoviendo la proliferación de membranas internas ¹⁴⁷; y para atacar la respuesta de defensa por parte de la célula hospedadora ¹⁴⁸, por otro lado, usan las proteínas celulares para facilitar su replicación ^{149,150}.

Las proteínas celulares que participan en el ciclo replicativo de los calicivirus son: la proteína JAM-1 que se ha descrito como receptor para la unión del FCV a las células CrFK ⁵⁹. Además se necesita de la proteína clatrina en el proceso de endocitosis del virión ¹²⁵. Se ha reportado que la proteína VPg, involucrada en la traducción, se encarga de reclutar a diferentes factores canónicos del inicio de la traducción como eIF3, eIF4GI, eIF4E, eIF2a, así como a la proteína ribosomal S6 ^{33,88-90}. También se ha reportado la interacción de la proteína NS1-2 de HuNoVs con SNARE (del inglés: soluble NSF attachment protein receptor), que es un regulador de membranas asociadas a vesículas de la proteína A (VAP-A) ⁷⁶, aunque el papel de esta interacción aún se desconoce.

Otros estudios demostraron interacciones entre las proteínas celulares con estructuras del RNA viral de los calicivirus, cuyas interacciones se han reportado como importantes para un eficiente ciclo replicativo de los calicivirus ^{67,151-153}

En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo, se demostró la interacción de las proteínas celulares PCBP (proteína de unión a trectos de poly C), La (auntoantígeno La), hnRNP-L (Ribonucleoproteína heterogénea nuclear L), PABP (poly A binding protein), PTB (proteína de unión a los trectos de polipirimidina) y nucleolina a las RNT 5' y 3' del RNA genómico de HuNoV^{67,154}; y el papel que juegan algunas de estas interacciones en el ciclo replicativo de estos virus ya han sido dilucidadas.

Por ejemplo, se demostró que la interacción del las proteínas PCBP-2 y hRNP A1 con el genoma de MNV estabilizan la interacción de los extremos 5' y 3' del genoma, permitiendo de esta manera la circularización del mismo, para un ciclo replicativo y por lo tanto producción de partículas eficiente¹⁵⁵. Las proteínas La y DDX3 se han encontrado también parcialmente localizadas en los RCs durante la infección, además, su silenciamiento genera una reducción en la producción de viriones¹⁵³

En otros estudios se demostró la interacción de la proteína PTB en los extremos 5' del genoma de FCV y al 3' del genoma de FCV y MNV^{61,152}. Particularmente, la proteína PTB inhibe la síntesis de proteínas virales en sistemas de traducción *in vitro*, y se ha postulado que esto ocurre como una llave para dar paso a la replicación del RNA¹⁵⁶. Esta inhibición no ocurre desde el inicio de la infección, sino cuando las proteínas virales se encuentran en el citoplasma en ciertos niveles, de tal forma que se cree que éste evento de inhibición se efectúa únicamente para dar paso a la replicación viral, y es por ello que también interacciona con la RNT 3' del genoma viral.

Así mismo, nuestro grupo de trabajo, ha determinado que la nucleolina, es una proteína que se requiere para que la replicación del FCV se lleve a cabo adecuadamente.

Nucleolina

Características de la proteína

La nucleolina (NCL) es una proteína de 707 aminoácidos, cuyo peso molecular teórico es de 77 kDa, sin embargo, debido a la alta carga negativa de aminoácidos en la región amino-terminal, tiene un peso molecular aparente de 105 kDa ^{157,158}. La NCL posee tres dominios: el dominio N-terminal, el dominio central y el dominio C-terminal (**Fig. 1.5**) ³.

El dominio N-terminal está codificado por el exón 2, 3, 4 y en seguida el exón 5, el cual codifica para la señal de localización nuclear (SLN) bipartita. Este dominio se caracteriza por poseer regiones con gran cantidad de aminoácidos ácidos, (regiones acídicas) a los cuales se les atribuye la función de inducir relajación de la cromatina a través de la interacción de los aminoácidos ácidos con la histona H1 ¹⁵⁹. También participa en muchas interacciones proteína-proteína, como con el U3 snoRNP ¹⁶⁰ y con otras proteínas ribosomales ¹⁶¹. El dominio N-terminal es altamente fosforilado por diversas cinasas: la casein-cinasa II (CKII), la Cdc2 y la protein-cinasa C-z. Se ha visto, que la fosforilación de la NCL incrementa su degradación por proteasas, lo que sugiere que la estabilidad de esta proteína es dependiente de su estado de fosforilación ^{157,162,163}.

El dominio central posee cuatro secuencias consenso o dominios de reconocimiento al RNA (CS-RBDs) y cada dominio consta de ~80 aa, éstos dominios le permiten a la NCL unirse con alta afinidad y especificidad a los 5' ETS (external transcribed sequence) de fragmentos de RNAr ^{164,165}. En este dominio se encontró un elemento pequeño de tallo-burbuja, compuesto de 5 pares de bases y una burbuja de 7-10 bases que contienen el dominio U/G CCCGA al cual se le denominó NRE (elemento de reconocimiento de la nucleolina, por sus siglas en inglés) ¹⁶⁶. Las características de este dominio, han sugerido fuertemente que la NCL es potencialmente capaz de interactuar con una gran cantidad de RNAs blancos, como a los RNAs que contienen repetidos teloméricos ¹⁶⁷ y a la RNT 3' de la proteína precursora amiloide β (*APP* β) ¹⁶⁸.

El dominio carboxilo-terminal, es rico en residuos Arg-Gly-Gly y posee residuos intercalados de dimetil arginina y de fenilalanina, es por ello que también es denominado dominio GAR (RGG) ¹⁶⁹. En general este dominio puede mediar interacciones proteína-proteína y proteína-ácido nucleico. Se ha visto que participa evitando la formación de estructuras secundarias del RNA, y además se demostró la interacción directa con un grupo de proteínas ¹⁶².

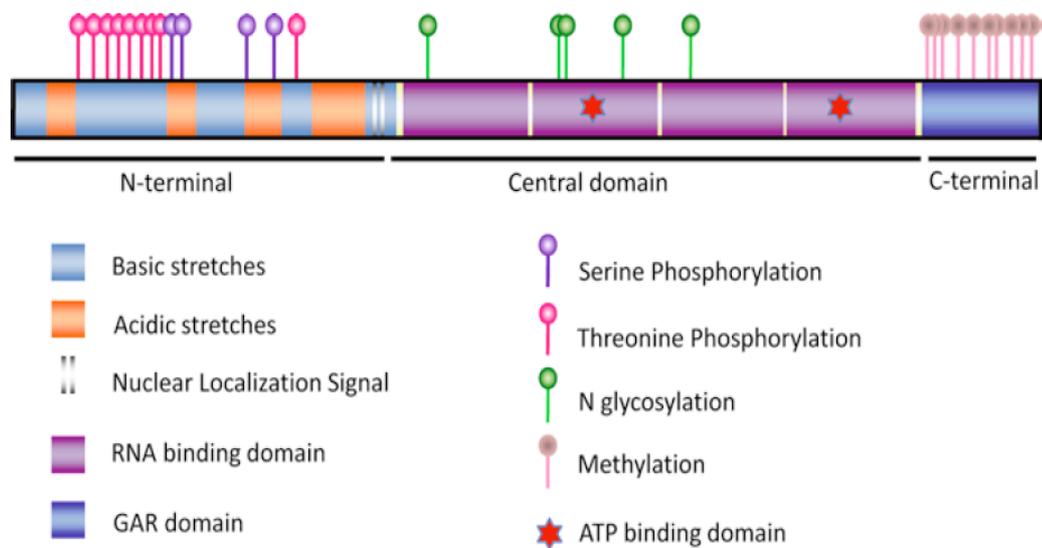


Figura 1.5. Representación esquemática de la NCL y las modificaciones post-traduccionales identificadas. El dominio N-terminal posee regiones ácidas y contiene a la señal de localización nuclear; el dominio central contiene a los 4 dominios o motivos de reconocimiento al RNA (RRM); por último el dominio C-terminal o dominio GAR contiene secuencias ricas en glicinas y argininas. Los residuos de treonina 58, 75, 83, 91, 98, 105, 120, 128, y 219 son fosforilados por la cinasa CKI. Los residuos de serina 143, 156, 187, y 209 son fosforilados in vivo por la CKII. Los posibles sitios de metilación son 655, 659, 665, 669, 673, 679, 681, 687, 691, y 694 en el dominio GAR. Los posibles sitios de glicosilación son 317–319, 399–401, 403–405, 477–479, y 491–493. Dos posibles sitios de unión a ATP también han sido localizados en los dominios de unión a RNA ³.

Localización subcelular y función.

La NCL, es una fosfoproteína mayoritariamente nucleolar, se encuentra en abundancia tanto en la región densa fibrilar como en las regiones granulares del nucléolo. La NCL representa el 5% del total de las proteínas nucleolares en las células que se encuentran activamente en división y se ha descrito que se degrada en varios tamaños generalmente por autodegradación cuando hay sobrecrecimiento en cultivo celular ¹⁵⁷. La NCL funciona también como autoantígeno y represor transcripcional ¹⁷⁰, tiene actividad de helicasa de DNA y de RNA, además de actividad de ATPasa dependiente de DNA, se regula por proteólisis, metilación, ADP-ribosilación y fosforilación (**Fig. 1.5**).

La NCL del nucléolo participa en la biogénesis del ribosoma ya que regula muchos aspectos del metabolismo del RNAr y del DNAr. Esta involucrada en la descondensación de la cromatina y en la nucleogénesis ¹⁵⁹, en el empaquetamiento del pre-RNAr, en la transcripción del RNAr y ensamble ribosomal ¹⁶⁴. La NCL se transloca del nucléolo al nucleoplasma después de la exposición de las células a radiación ionizante y a choque térmico; y más tarde se transloca al citoplasma ¹⁷¹ y finalmente mediante pequeñas vesículas es translocada a la membrana celular. Este transporte es dependiente de microfilamentos de actina e independiente de RE y del AG ¹⁷².

Se ha demostrado que la NCL que se encuentra en el citoplasma, se une a los mRNAs para influir en su estabilidad y traducción. Se une las RNTs 3' de los mRNAs de *BCL2*, de la *APP* β y de la β -globina (*HBB*) para promover su estabilidad o evitar su degradación ^{168,173-175}. También se une a las RNTs 5' de los mRNAs de la interleucina 2 (*IL2*) y de la sintasa 1 de la prostaglandina endoperoxidasa H (*PGHS1*) para regular su traducción ^{176,177}. Además se ha reportado que la NCL potencia la traducción de un grupo de mRNAs al unirse a regiones ricas en G, cuyos sitios de interacción se encuentran en regiones codificantes y no codificantes ¹⁷⁸.

La NCL de la membrana constituye el 5% de toda la proteína celular ¹⁷⁹ y menos del 20% de la NCL citoplásmica ¹⁷². La expresión de la NCL en la superficie es dependiente de la proliferación, de tal manera que su expresión

disminuye cuando se genera arresto del ciclo celular ¹⁸⁰. En las células epiteliales como las del tracto respiratorio se localiza en regiones específicas, como en zonas apicales ¹⁷⁹.

La NCL de superficie sirve como receptor para diferentes factores de crecimiento, los cuales en algunos casos se ha demostrado que interactúan a través de su dominio C-terminal ^{181,182}. De manera interesante, otros ligandos de la NCL de superficie juegan un papel crítico en la tumorigenesis y angiogenesis. Por ejemplo se une a factores de crecimiento y proteínas como midkine y pleiotropina generando un efecto mitogénico y angiogénico ^{183,184}. Otros ligandos de la NCL de superficie son la laminina-1, el factor J, las selectinas L y P, y el factor de crecimiento de hepatocitos, cuyos factores están involucrados en el desarrollo tumoral, inducción de diferenciación celular, regulación de la adhesión celular, tráfico de leucocitos, inflamación y angiogénesis ¹⁸⁵⁻¹⁹⁰.

Por otro lado, se ha reportado que los oligodeoxinucleótidos ricos en guaninas (GROs) que forman cuádruplex, interactúan con la NCL que se expresa en la superficie de las células que lo expresan, causando de esta manera la pérdida de su función ¹⁹¹⁻¹⁹³. En la actualidad el GRO mejor estudiado es el aptámero AS1411 o comúnmente llamado AGRO100, el cual se une directa y selectivamente a la NCL y tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento celular lo cual correlaciona con su capacidad de unión a la NCL de superficie ^{194,195}.

Además de los propósitos terapéuticos y de diagnóstico de los aptámeros, estos han sido usados para caracterizar el papel de su proteína blanco bajo diferentes condiciones. Por ejemplo con el uso de aptámeros específicos para la proteína PTB, se determinó la participación de esta proteína en el inicio de la traducción IRES dependiente del HCV en el sistema de RRL ¹⁹⁶. También, con ayuda de aptámeros se caracterizaron las interacciones de eIF4G con eIF4A e eIF3 ¹⁹⁷. Así mismo el aptámero AGRO100 fue usado para determinar que la NCL participa en la morfogénesis del virus Dengue ¹⁹⁸; por otro lado, éste mismo aptámero fue usado para demostrar que la NCL de superficie de macrófagos es el receptor “scavenger” de lipoproteínas de baja densidad (LDL) ¹⁹⁹.

En el siguiente esquema se muestran los sitios de localización y algunas de sus funciones en la célula (**Fig. 1.6**)¹⁶³.

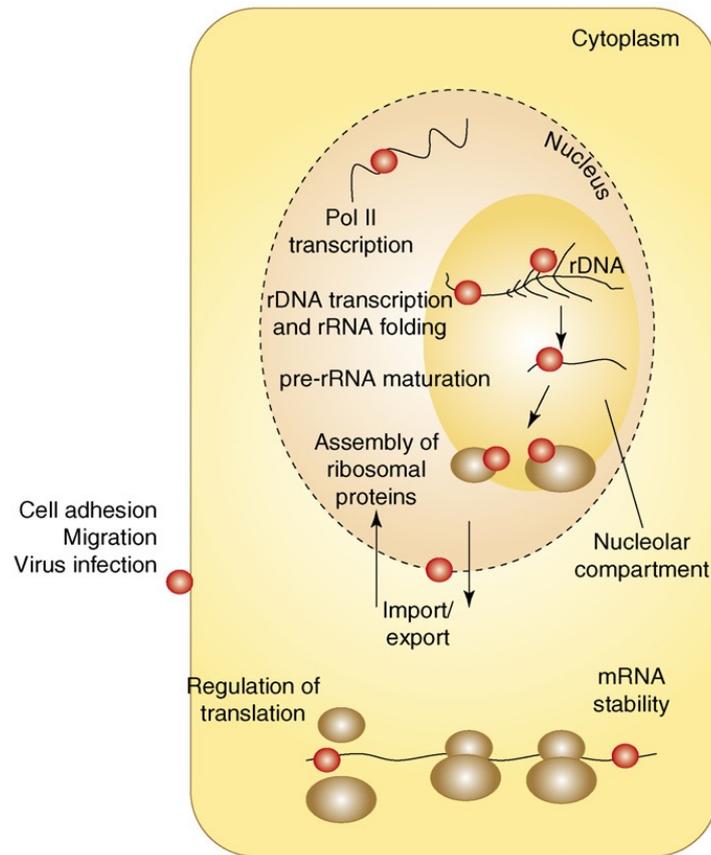


Figura 1.6. Distribución de la nucleolina en los diferentes compartimentos celulares y sus funciones. *Nucleólo:* transcripción de DNAr y plegamiento de RNAr, maduración de pre-RNAr, ensamble de proteínas ribosomales. *Núcleo:* regula la transcripción de la Polimerasa II, regula el importe y exporte de diversas proteínas o componentes nucleolares. *Citoplasma:* estabiliza y regula la traducción de los RNAm. *Superficie celular:* puede funcionar como una proteína de adhesión celular, para la migración celular o como receptor para infección viral. La nucleolina esta representada en los círculos rojos¹⁶³.

ANTECEDENTES DIRECTOS

Inicialmente, en el laboratorio se identificó a la nucleolina como una de las proteínas que interacciona con la RNT 3' del genoma del virus Norwalk. Dado que hasta hace poco tiempo se desarrolló el sistema de cultivo para los HuNoVs, fue imposible determinar su posible papel funcional en éste, por lo que se evaluó el papel de la NCL en el modelo subrogado de FCV.

En general, la participación de las proteínas en procesos replicativos virales, puede observarse por sobreexpresión o disminución de la expresión de una proteína celular, o bien por un cambio en su localización subcelular. En células CrFK infectadas con FCV, no se observó ningún efecto aparente sobre los niveles basales de la proteína y del RNAm de la nucleolina, sin embargo, la infección por FCV dio como resultado la relocalización de la NCL, del nucléolo al nucleoplasma, particularmente en los complejos replicativos adosados en la región perinuclear, en donde colocalizó con la proteína NS6/7 (proteasa-polimerasa) del FCV. El que la NCL se uniera a la RNT 3' y a la proteína NS6/7 viral, sugería fuertemente su participación en el ciclo replicativo viral, lo cual fue corroborado por la interferencia de su expresión con siRNAs específicos, con lo que se demostró un marcado efecto inhibitorio en la replicación del FCV en las células CrFK²⁰⁰.

Sin embargo, a pesar de saber que esta proteína es importante para que el ciclo replicativo de FCV se lleve a cabo de manera eficiente, aún se desconocía en que etapa del ciclo replicativo participaba de forma específica, y el saberlo nos permitiría conocer un poco más de su biología. Más aún, dado que los calicivirus que infectan a humanos representan un problema de salud pública, es importante conocer de que depende su replicación, con el fin de desarrollar estrategias de control.

JUSTIFICACIÓN

Todos los procesos de la replicación de los virus de RNA, como los calicivirus, están regulados por la participación de proteínas celulares, y se cree que éstas promueven la interacción de proteínas celulares con los extremos terminales 5' y 3' del genoma viral, modulando de ésta manera, la traducción y la replicación del RNA.

En nuestro laboratorio se demostró que la NCL participa en el ciclo replicativo del FCV, sin embargo, aún desconocemos el proceso o procesos específicos en los cuales participa en el ciclo replicativo del FCV

En la actualidad, son pocos los reportes acerca de la caracterización de proteínas celulares que participan en el ciclo replicativo de los calicivirus, por lo que el caracterizar la participación de la NCL en el ciclo replicativo del FCV nos permitirá conocer un poco más acerca de la biología de los calicivirus y las moléculas celulares que lo regulan y en un futuro usarlas para el control del FCV o los calicivirus en general.

Dado que el calicivirus felino representa uno de los modelos de los cuales se poseen más herramientas biológicas y metodologías muy bien descritas, nos permite de forma relativamente fácil desarrollar estrategias de investigación. Además las estrategias replicativas de la familia *Caliciviridae*, en general son semejantes y por ello se considera que cualquier hallazgo en alguno de los modelos nos guiará sobre lo que pudiera estar ocurriendo en los calicivirus humanos.

HIPÓTESIS

La proteína NCL participa en diferentes procesos del ciclo replicativo del FCV.

OBJETIVO GENERAL

Identificar el o los procesos en los que participa la proteína NCL en el ciclo replicativo del FCV

OBJETIVO PARTICULARES

- ✚ Evaluar la participación de la NCL en la unión del FCV a las células CrFK (fibroblastos de riñón de gato).
- ✚ Evaluar la participación de la NCL en la entrada del FCV a las células CrFK (fibroblastos de riñón de gato).
- ✚ Demostrar la interacción de la proteína NCL con la RT 5' y la RNT 3' del RNA viral del FCV.
- ✚ Determinar la participación de la NCL en la traducción del RNA viral del FCV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular y virus

Las células CrFK fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD), y cultivadas en medio DMEM Advanced (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 2 mM de L-glutamina y con 10% de suero fetal bovino, 5,000 U of penicilina y 5 µg/ml of streptomina. El cultivo celular fue incubado en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C.

Se usó el virus FCV cepa F9. Para determinar el título viral de FCV se realizaron ensayos de plaqueo como se reportó en estudios anteriores²⁰¹.

Ensayo de inmunofluorescencia

Se cultivaron células CrFK (1.5×10^5) en una multiplaca de 6 pozos, en cuyos pozos fueron colocados cubreobjetos pre tratados con poly-L-lysina (0.1%), y las células se dejaron crecer toda la noche. Las células fueron lavadas una vez con amortiguador de fosfatos (PBS) y tratadas con 2% paraformaldehído-PBS durante 15 minutos (min). Para permeabilizar las células, se adicionó a cada pozo, 500 µl de acetona 100% durante 2 min e inmediatamente fueron lavadas tres veces con PBS frío (cada lavado de 5 min), posteriormente las células fueron bloqueadas con suero de chivo al 5% en PBS, durante 30 min a 4°C. Las células fueron lavadas con PBS frío durante 1 min. Las muestras fueron incubadas con 4 µg/ml del anticuerpo anti-NCL (C23, H-250, Santa Cruz Biotechnology) en suero de chivo al 5% a 4°C toda la noche. Las muestras fueron lavadas tres veces con PBS frío durante 10 min e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (Invitrogen) diluido en suero de chivo al 5% durante 2 h a temperatura ambiente

(TA). Las muestras fueron lavadas tres veces con PBS e incubadas con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de dihidrocloruro 4', 6-diamidino-2-phenilindol (DAPI) durante 10 min. Las muestras fueron lavadas dos veces con PBS frío, y luego fueron tratadas con solución de montaje Vecta-Shield (Vector Laboratories A. C.) y analizadas usando el microscopio confocal TCS SP8 Leica.

Biotinilación de superficie celular

La metodología que se uso para este ensayo fue desarrollada como se describió previamente, con algunas modificaciones^{193,202}. Se cultivaron (1×10^7) células CrFK durante una noche, transcurrido este tiempo, fueron lavadas con amortiguador de fosfatos suplementado con 0.1 mM Ca^{2+} y 1mM Mg^{2+} (PBS+) e incubadas con 1 mg/ml de hexanoato sulfosuccinimidil-6- (biotina-amida) hexanoato (Pierce) a 4 °C durante 2 h con agitación ligera. Posteriormente, la unión de la biotina fue frenada por la incubación de las células con PBS-100 mM glicina durante 2 min a 4 °C. Como control negativo, se usaron células que fueron tratadas con las mismas soluciones pero sin la biotina. Después, las células fueron lavadas con PBS+ y lisadas con el amortiguador de lisis (1% Triton X-100, deoxicolato de sodio 0.05%, 5 mm EDTA, 30 mm Tris-HCl (pH 7.4), 150 mm NaCl, inhibidor de proteasas (complete mini Roche) y 10% glicerol). Los lisados fueron centrifugados durante 5 min a 15,000 g. Para aislar las proteínas biotiniladas, los sobrenadantes (3.0 mg de proteína) fueron interaccionados con 1 ml agarosa-streptavidina (Pierce), la cual fue previamente equilibrada con el amortiguador de lisis y posteriormente incubada toda la noche a 4 °C con agitación suave. El complejo agarosa-streptavidina-biotina-proteína fue lavado con amortiguador de lisis, después, las proteínas fueron solubilizadas con

amortiguador de muestra de proteínas SDS-PAGE (50 mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 6% glicerol, 0.1 M ditioneitol, 1 mM fluro-fenilmetilsulfonil, 0.015% azul de bromofenol) durante 5 min a 95°C y fueron sujetas a electroforesis en un gel SDS-PAGE (10%). Para la detección de la NCL, se realizó un ensayo tipo Western blot usando el anticuerpo H-250 y como control de no contaminación con proteínas internas, se uso el anticuerpo anti-hnRNP A1 (sc-32301) ya que se expresa únicamente en citoplasma y núcleo. Finalmente las proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia (Thermo Scientific™SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate).

Detección de la NCL en la superficie de las células CrFK mediante citometría de flujo.

Las células CrFK fueron cosechadas con PBS-EDTA 0.02%, (1×10^6 de células para cada condición), y empastilladas a 3000 rpm durante 5 min, procesadas en los tubos para citometría de flujo. Las células fueron lavadas con amortiguador de citometría de flujo (PBS-BSA 2% y 0.1% de NaN₃) e incubadas con el anticuerpo H-250 durante 1h a 4°C. Las células fueron lavadas tres veces con amortiguador de citometría a 3000 rpm durante 5 min e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (Invitrogen) durante 1 h a 4 °C. Las muestras fueron lavadas tres veces con amortiguador de citometría a 3000 rpm durante 5 min y resuspendidas en amortiguador de citometría con 4% de formaldehido en PBS. Finalmente, las muestras fueron analizadas con el citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, MN).

Ensayo de unión de virus mediante citometría de flujo.

Este ensayo se realizó usando un método previamente descrito ⁵⁹. Brevemente, las células CrFK (1×10^6) fueron procesadas de la misma manera como se describió anteriormente. Las células fueron lavadas una vez con el amortiguador de citometría e incubadas con el concentrado de viriones de FCV (5 μ l) durante 30 min a 4 °C. Para los experimentos de bloqueo, las células fueron incubadas con el suero preinmune del anticuerpo anti-JAM-1 (1:5), con el anticuerpo anti-JAM-1 (1:5), y con el anticuerpo anti-NCL (40 μ g/ml), o con el anticuerpo anti-IgG de conejo (40 μ g/ml) durante 1h a 4 °C, previo a la incubación con el concentrado de viriones. Las muestras fueron lavadas dos veces con el amortiguador de citometría e incubadas con el anticuerpo anti-FCV(FCV1-43), el cual reconoce un epítipo de la proteína de la cápside, durante 1h a 4 °C. Las muestras fueron lavadas tres veces con el amortiguador de citometría e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 h a 4°C. Las células fueron lavadas tres veces con el amortiguador de citometría y analizadas con el citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, MN).

Para los ensayos de unión, las células CRFK fueron cultivadas en frascos de 175cm² e infectados con el FCV a una MOI (del inglés: multiplicity of infection) de 0.01; el sobrenadante fue colectado 24 horas postinfección, colocado en un colchón de sacarosa al 25% en PBS (5 ml) y ultracentrifugado a 120,000 \times g durante 2 h a 4°C. La pastilla fue resuspendida en PBS. La suspensión fue centrifugada a 650 \times g para remover la materia insoluble y posteriormente fue usado para los ensayos de unión.

Experimentos de inhibición

Las células CrFK fueron sembradas (1.5×10^4) un día previo al ensayo en una multiplaca de 96 pozos, posteriormente fueron lavadas con PBS e incubadas con el suero pre y post inmune de anti-JAM-1 (1:3), anti-IgG de conejo (1:3), anti-NCL (40 $\mu\text{g/ml}$) o anti- IgG de conejo (40 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 h a 37°C. Después de la incubación, los anticuerpos fueron removidos y las células fueron incubadas con FCV a una MOI de 0.01 durante 1 h a 37°C. Después de 24 h.p.i, el efecto citopático fue evaluado mediante microscopía de contraste de fases. Para los ensayos de competencia, las proteínas FL rNCL o BSA (120 nM de cada una) fueron incubadas con el virus de FCV (MOI= 0.01) durante 3h a RT, y la mezcla de proteína y virus preincubados fueron adicionados a las células CrFK con una confluencia de ~ 80% en placas de 96 pozos. La mezcla se retiró después de 1 h a 37°C. Después, la infección se mantuvo durante 24 h a 37°C. Los sobrenadantes de las células infectadas fueron colectados y el título viral fue determinado mediante ensayo de plaqueo.

Clonación, expresión y purificación de la proteína recombinante Δ rNCL.

El amplicón Δ NCL que contiene a la secuencia de la NCL humana que corresponde a los aminoácidos 301-710 fue obtenido del cDNA de células HeLa usando la DNA polimerasa *Pfu* (Thermo Fisher Scientific) y el par de primers que contenían los sitios de restricción EcoRI y XhoI en el extremo 5' y 3' final, respectivamente (FW5'-ACCATGGAATTCACAGAACCGACTACGGCTTTC-3', y RV5'-GCCTTTCTCGAGCTATTCAAACCTTCGTCTTCTTTCC-3'). El amplicón fue clonado en el vector de tránsito pJET1.2 (Thermo Scientific), y posteriormente subclonado en los sitios de restricción de las enzimas EcoRI y

XhoI en el vector de expresión procariota pGEX5X.1. El plásmido resultante fue denominado pGEX5X.1- Δ rNCL, el cual contiene la versión truncada del gen de la NCL que carece de la región amino terminal. Para expresar la proteína Δ rNCL, las bacterias *E.coli* BL21 fueron transformadas con la construcción pGEX5X.1- Δ rNCL y cultivadas hasta alcanzar una OD 0.6. La inducción de la proteína fue realizada por la adición 0.1 mM de IPTG, y su posterior cultivo durante 4 h a 37 °C. La proteína recombinante fue purificada de la siguiente manera: las células fueron empastilladas por centrifugación (JA-10 Beckman Coulter 30 min a 11,435 x g) y resuspendidas en amortiguador de lisis, el cual contiene PBS-Triton X100 1%, lisozima (100 mg/ml) e inhibidor de proteasas (complete, Mini Roche). Las células fueron incubadas durante 30 min a 4 °C y sonicadas hasta que la suspensión se aclaró. Después, el lisado fue centrifugado (JA-20 Beckman Coulter 30 min a 17,250 x g) y el sobrenadante fue incubado con glutatión-agarosa (G4510 Sigma-Aldrich) durante 1 h, a 4 °C, el complejo perla-proteína fue lavado tres veces con PBS-Tritón X100-1. Finalmente, la proteína fue eluida con 500 μ l del amortiguador de elución (10 mM L-glutatión reducida G4251 (Sigma-Aldrich), 15 mM Tris-HCl pH 8.0). La proteína eluida fue dializada contra un amortiguador que contiene 20 mM MOPS pH 7.2, 10 mM NaCl, 50 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT. La proteína Δ rNCL fue almacenada a -80 °C.

Para la expresión de GFP- Δ rNCL en las células CrFK, el amplicón correspondiente a los aminoácidos 301-710 de la NCL de humano (Δ rNCL), fue amplificado del cDNA de células HeLa usando la DNA polimerasa *Pfu* (Thermo Fisher Scientific) y un par de primers con los sitios de restricción EcoRI y ApaI en el extremo 5' y 3' final, respectivamente (subrayados): FW5'-

ACCATGGAATTCTACAGAACCGACTACGGCTTTC-3', y RV5'-GCCTTTGGGCCCTATTCAAACCTTCGTCTTCTTTCC. El amplicon fue clonado en el vector de tránsito pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific) y subclonado en los sitios de restricción de las enzimas EcoRI y ApaI del vector de expresión eucariota pEGFP-C1 (Clontech, Laboratories). El plásmido resultante fue denominado pEGFP-C1-ΔrNCL, el cual contiene la versión truncada del gen de la NCL (**Figura 3.3 A**), se encuentra bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). Las construcciones fueron secuenciadas para asegurarse que no hubieran mutaciones.

Transfección estable de la proteína GFP-DrNCL en las células CrFK.

Las células CrFK fueron transfectadas por electroporación con el Nucleofector™ Technology (programa T-020), usando 1μg del vector vacío pEGFP-C1 o la construcción pEGFP-C1-ΔrNCL. Para realizar transfección estable, las células fueron seleccionadas con medio de cultivo suplementado con 2.5 mg/ml de Geneticina (G418; Sigma Aldrich). Las células transfectadas de manera estable fueron mantenidas como poblaciones en presencia de 0.5 mg/mL de G418.

Transcripción *in vitro*

Dos amplicones correspondientes a la región terminal 5' (1-182 nt) y a la RNT 3' completa (7646-7690 nt) del RNA genómico de FCV fueron obtenidos por PCR a partir del cDNA de células CrFK infectadas con FCV, como se describió previamente ²⁰³. Los primers sentido contienen la secuencia promotora del bacteriófago T7 (5'RT-FW 5' -

TAATACGACTCACTATAGGGGTAAAAGAAATTTGAGAC-3', 5'RT-RV5'-
CATTGTCGAAGACCCGTC-3') y (3'RNT-FW-5'
TAATACGACTCACTATAGGGTCATATATCCCTTTGGG, 3'RNT-RV-5'
CCCTGGGGTTAGGCGCAGG-3'). Los productos de PCR fueron obtenidos con
la DNA polimerasa *Pfu* (Thermo Fisher Scientific) bajo el siguiente protocolo:
94°C 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 50°C durante 30 s, y
72°C durante 30 s, usando el termociclador Perkin-Elmer. Las sondas de RNA
fueron obtenidas mediante transcripción *in vitro* (MEGAscript® T7 Transcription
Kit-Life Technologies), y las reacciones fueron tratadas con la DNAsa I a 37°C
durante 30 min para remover el DNA utilizado como molde para la reacción. Los
nucleótidos no incorporados fueron removidos mediante extracción de
fenol:cloroformo y posterior precipitación con isopropanol. Para la síntesis de
transcritos radiomarcados fue incluido el [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP en la mezcla de reacción.

Ensayo de movilidad electroforética (EMSA).

Los EMSA fueron realizados usando un método previamente descrito ²⁰³.
Concentraciones crecientes de ΔrNCL fueron preincubados durante 15 min a 4°C
con la misma cantidad de tRNA en un amortiguador que contiene 10 mM de
HEPES (pH 7.4), 0.1 mM de EDTA, 0.2 mM de ditioneitol (DTT), 8 mM de
MgCl₂, 40U de RNAsin (Promega) y 10% (vol/vol) de glicerol en un volumen
final de 15 μl . La mezcla de reacción fue incubada durante 30 min a 4°C. Se
adicionaron cantidades de 4×10^5 cpm de las sondas RT 5' o la RNT 3' marcadas
con [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP y se incubaron durante 15 min a 4°C. Las muestras fueron
incubadas con 20 unidades de RNasa A y 20 μg de RNasa T1 durante 15 min a
TA, antes de ser cargadas en los geles no desnaturizantes. Los complejos fueron

cargados y analizados en geles no desnaturizantes al 4% (RT 5') y 8% (RNT 3') con acrilamida-bisacrilamida 29:1. Los geles fueron secados, y revelados por autoradiografía. Para los EMSA realizados con FITC- AGRO-100, los complejos fueron observados en el sistema ChemidocTM MP Imagine con ayuda del software Image lab (Bio-Rad).

Ensayos de traducción *in vitro*.

El VPg-RNA de FCV fue purificado de las células CrFK infectadas a una MOI de 40 durante 8 h. Los ensayos de traducción *in vitro* se realizaron con el sistema de lisado de reticulocitos de conejo (RRL, Promega). Cada reacción fue realizada a un volumen final de 12.5µl que incluía 6.25µl de RRL, 20µM de mezcla de aminoácidos, 100 mM de KCl, 2 mM de DTT, 0.5 mM de MgOAc, 5 µCi³⁵S de metionina (1000 Ci/mmol) (GE Healthcare), 20U de RNAsin (Promega) y 400 ng de VPg -RNA de FCV. Las reacciones fueron incubadas a 30°C durante 1.5 h. Los geles fueron secados y se revelaron por autoradiografía. Las proteínas ΔrNCL, y la versión completa FLrNCL obtenida comercialmente (OriGene) fueron dializadas contra el amortiguador que contiene 20 mM de MOPS pH 7.2, 10mM de NaCl, 50mM de KCl, 1.1 mM de MgCl₂, 0.1 mM de EDTA y 0.5mM de DTT. El AGRO100 fue adicionado en distintas cantidades (según se indica) en las reacciones de traducción *in vitro*. Cuando la proteína FLrNCL fue incluida, el volumen final de la reacción fue de 37 µl; el resto de las reacciones del experimento fueron ajustadas al mismo volumen con amortiguador de diálisis.

RESULTADOS

Detección de la NCL en la superficie de las células CrFK.

Nuestro laboratorio reportó previamente que la NCL participa en el ciclo replicativo del FCV ²⁰³, en donde por ensayos de silenciamiento en las células CrFK, se observó una reducción en la producción de partículas virales de FCV, sin embargo, desconocíamos en que proceso o procesos específicos del ciclo replicativo la NCL podría estar participando. Para poder determinar el o los papeles específicos de la NCL en el ciclo replicativo del FCV, primero evaluamos el papel de ésta proteína en la unión y en la internalización del virus FCV a las células CrFK. Inicialmente era necesario determinar si la NCL se expresaba en la superficie de las células CrFK, por lo que se realizó inmunofluorescencia con células CrFK permeabilizadas y sin permeabilizar, las cuales fueron incubadas con el anticuerpo anti-NCL (H-250). En las células permeabilizadas se observa la distribución y expresión de la proteína NCL mayoritariamente en los nucléolos (**Fig. 1.7, panel de arriba**), mientras que en las células no permeabilizadas la distribución de la NCL se observa únicamente en la superficie de las células, lo que sugería que la NCL estaba presente en la superficie celular (**Fig. 1.7A, panel de abajo**). Para corroborar la presencia de la NCL en la superficie celular, se realizaron ensayos de citometría de flujo en los que se evaluó el nivel de expresión de la proteína NCL en células CrFK no permeabilizadas (**Fig. 1.8**). Las células CrFK no permeabilizadas, fueron incubadas con el anticuerpo anti-NCL (línea negra) o con el anticuerpo anti-IgG (área sombreada en gris) como control de isotipo. En el histograma representativo podemos observar el desplazamiento de la curva en color negro que demuestra que, el 32% de las células analizadas expresan la proteína NCL en la superficie (**Fig. 1.8**). Para confirmar la presencia

de la NCL en la superficie de las células CrFK, éstas fueron biotiniladas (**Fig. 1.9**), con una biotina que es impermeable a las células. Las proteínas biotiniladas fueron aisladas por la adición de perlas recubiertas de streptavidina, y mediante un ensayo tipo Western-blot utilizando anticuerpos anti-NCL, se observó una banda de alrededor 110-kDa, indicando que la NCL se encuentra en la superficie de las células CrFK (**Fig. 1.9 +**), como se esperaba, no se detectó a la proteína hnRNP A1, la cual fue utilizada como control negativo de contaminación de proteínas citoplásmicas y/o nucleares. Ninguna de estas proteínas fue detectada en los extractos no marcados con biotina, como era de esperarse, mientras que ambas proteínas se detectaron en los extractos totales de las células biotiniladas y no biotiniladas sin precipitar (input), indicando que ambas proteínas estaban presentes en los extractos y que estos no contenían componentes celulares internos. Tomando en cuenta los resultados de las tres estrategias experimentales demostramos la presencia de la NCL en la superficie de las células CrFK.

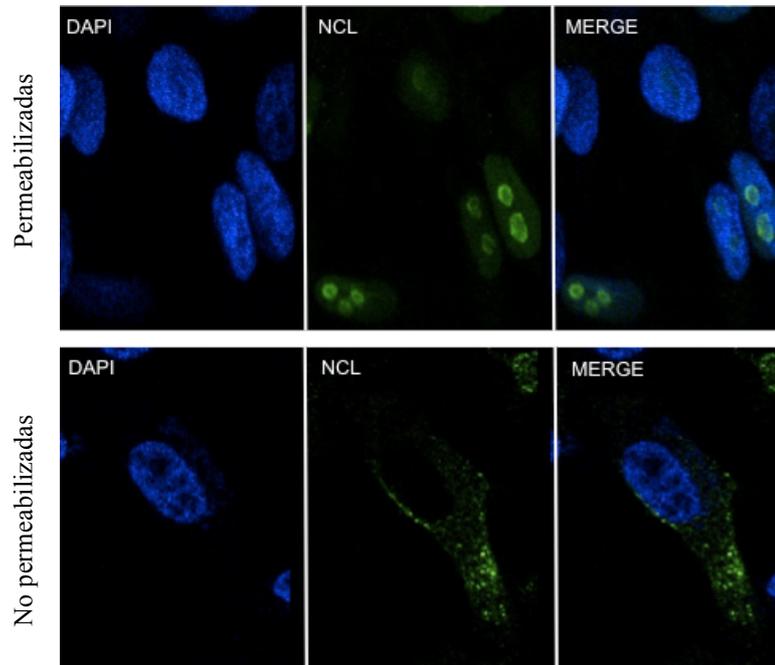


Figura 1.7. Expresión de la nucleolina en la superficie de las células CrFK mediante inmunofluorescencia. Células CrFK no permeabilizadas y permeabilizadas con acetona, fueron teñidas con el anticuerpo anti-NCL (H-250), y visualizadas por inmunofluorescencia indirecta usando el anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (verde). El DAPI fue usado para marcar los núcleos (azul).

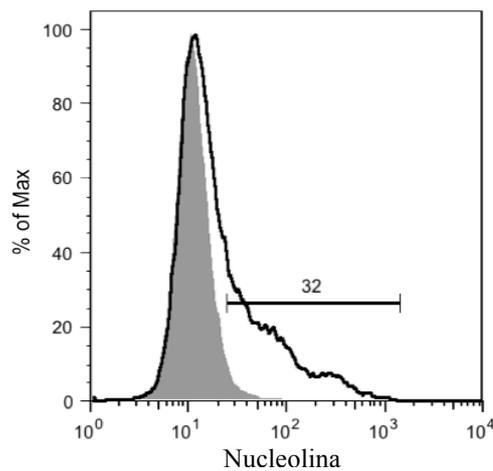


Figura 1.8. Niveles de expresión de la nucleolina en la superficie celular de las células CrFK mediante citometría de flujo. Células CrFK no permeabilizadas fueron incubadas con anticuerpo anti-NCL (línea negra) o con anticuerpo anti-IgG de conejo (área sombreada en gris), como control de isotipo.

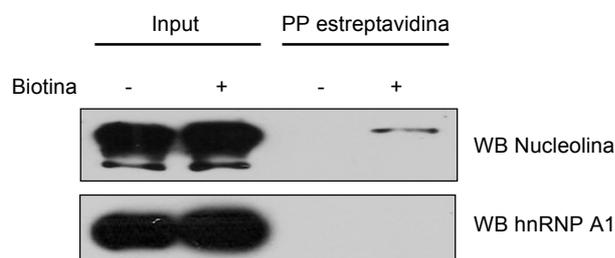


Figura 1.9. Detección de la nucleolina en componentes membranosos de superficie de las células CrFK. Las células CrFK fueron tratadas con sulfosuccinimidil-6- (biotina-amida) hexanoato (+) o con el vehículo (-); el extracto proteico de las células biotiniladas fueron precipitadas (PP-estreptavidina) o no (Input), y separadas en un gel desnaturizante SDS-PAGE. La proteína NCL y la proteína hnRNP A1 fueron detectadas por Western-blot usando el anticuerpo anti- NCL y el anticuerpo anti-hnRNP A1 respectivamente.

El anticuerpo anti-NCL no inhibe la unión del virus FCV a la superficie de las células CrFK.

Con el fin de evaluar si la NCL presente en la superficie de las células CrFK participa en la unión del FCV, bloqueamos la NCL de superficie de las células CrFK con el anticuerpo anti-NCL usado anteriormente en la detección de la NCL de superficie. Primero establecimos el sistema de detección de viriones sobre la superficie de las células CrFK mediante citometría de flujo. Después de concentrar los viriones de FCV mediante colchones de sacarosa, realizamos una curva de unión virus-célula con diferentes volúmenes de concentrado de viriones y la detección de la unión virus-célula se realizó mediante citometría de flujo. La curva en rojo y azul que corresponden al anticuerpo secundario y a las células no incubadas con el concentrado de viriones respectivamente, lo que nos indican el fondo de la tinción (**Fig. 2.1**). El desplazamiento hacia la derecha, de las curvas en verde, naranja, azul cielo y fucsia, corresponden a las concentraciones crecientes de viriones con los cuales las células CrFK fueron incubadas. Dado que a partir de

los 5 μ l observamos la unión de los virus a las células, y que el desplazamiento de la curva es semejante al obtenido con las concentraciones mayores de virus, decidimos trabajar con este volumen, con el fin de no saturar el sistema e interpretar adecuadamente los experimentos posteriores (**Fig.2.1**).

Después de establecer la interacción entre las partículas virales y las células CrFK, procedimos a realizar los experimentos de bloqueo, en los cuales preincubamos a las células con los correspondientes anticuerpos y posteriormente las incubamos con el concentrado de viriones (5 μ l), y evaluamos la unión mediante citometría de flujo (**Fig. 2.2A**). La curva de las células pre-incubadas con 40 μ g/ml del anticuerpo anti-NCL (**Fig. 2.2A, curva azul**), es semejante a la curva de las células que no fueron incubadas con algún anticuerpo (**Fig. 2.2A, curva azul claro**), demostrando que no hay inhibición de la unión de viriones de FCV a la superficie de las células sin embargo, como se esperaba, la curva de las células preincubadas con el anticuerpo anti-JAM1 de ratón (amablemente donado por los doctores K. Green y S. Sosnovtsev, NIH) a una dilución 1:5, muestra un retraso en el desplazamiento de la curva, demostrando una inhibición parcial de la unión de los viriones de FCV a las células CrFK (aproximadamente 50% menos con respecto a la intensidad media de fluorescencia de las células que no fueron incubadas con un anticuerpo) (**Fig. 2.2A, curva rosa**). Las curvas de las células que fueron incubadas con el suero preinmune del anticuerpo anti-JAM1 a una dilución 1:5, o incubadas con anti- IgG de conejo a 40 μ g/ml, mostraron un desplazamiento semejante a la curva de las células que no fueron incubadas con anticuerpo, lo que demuestra que no hubo inhibición de unión de los viriones FCV a las células CrFK (**Fig. 2.2A, curvas en azul claro, verde y rojo respectivamente**). La gráfica de barras representa el promedio y la desviación

estándar de las intensidades media de fluorescencia de tres experimentos independientes (**Fig. 2.2B**). Los resultados presentados nos demuestran que la NCL no participa en la unión de los viriones de FCV a las células CrFK.

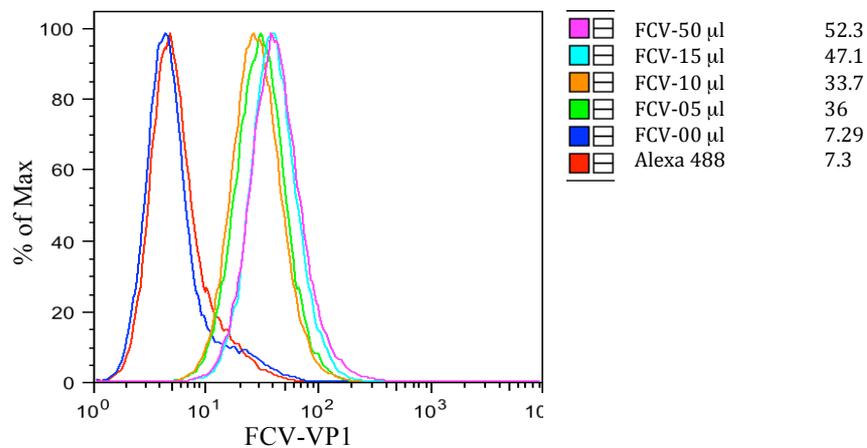


Figura 2.1. Detección de partículas de FCV en la superficie de las células CrFK. Se incubaron volúmenes crecientes del concentrado de viriones de FCV obtenido mediante colchones de sacarosa con las células CrFK a 4°C/1hr (5,10,15,50 µl). Se realizó la detección de los viriones unidos a las células CrFK mediante citometría de flujo, usando el anticuerpo anti-FCV (FCV1-43).

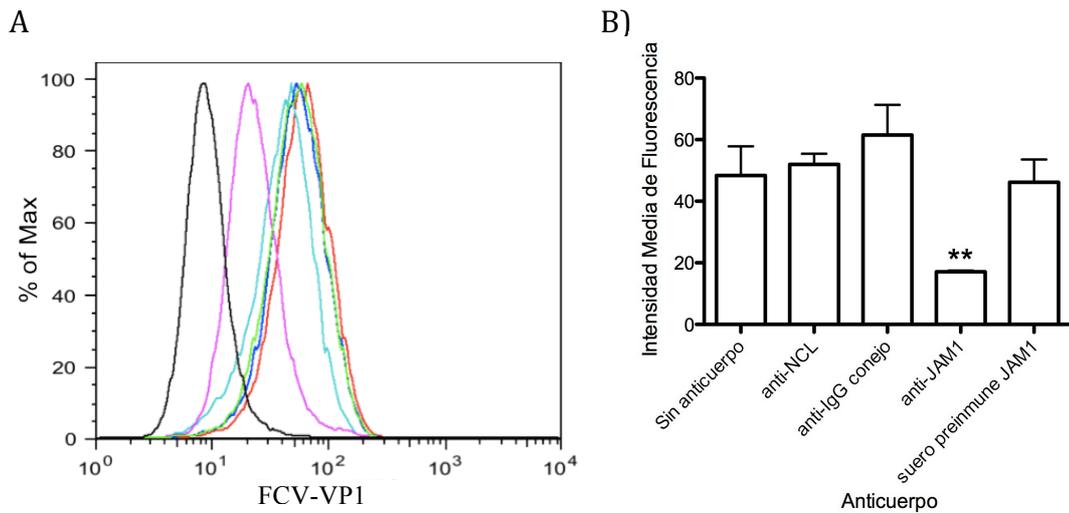


Figure 2.2. El anticuerpo anti-NCL no inhibe la unión del FCV a las células CrFK. A) Células CrFK no tratadas (curvas en negro y azul claro), o tratadas con los anticuerpos anti-JAM-1 (curva fucsia), anti-NCL (curva azul) y anti-IgG de conejo (curva roja) o con el suero preimmune de JAM-1 (curva verde), fueron incubadas con el concentrado de partículas de FCV. Las partículas presentes en la superficie de las células fueron detectadas mediante citometría de flujo usando el anticuerpo comercial anti-FCV (Santa Cruz Biotechnology). B) La gráfica de barras representa las intensidades medias de fluorescencia de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. Valor de $P < 0.001$ (**) se indican.

El anticuerpo anti- NCL y la proteína FLrNCL no inhiben la internalización del virus FCV a las células CrFK.

Después de demostrar que el anticuerpo anti-NCL no interfiere con la unión del FCV a las células CrFK, era importante evaluar si podría tener la capacidad de inhibir la internalización y como consecuencia disminuir el efecto citopático (CPE) generado por la infección de FCV en las células CrFK (**Fig. 2.3A**). Es por eso que las células CrFK fueron incubadas con los diferentes anticuerpos previo a la infección, posteriormente se evaluó el efecto citopático inducido por la infección mediante microscopía de contraste de fases (**Fig. 2.3A**). Cuando las células se pre incubaron con el anticuerpo anti-JAM-1 a una dilución 1:5, se observó una reducción significativa en la capacidad del FCV para producir CPE, comparado con las células que no fueron incubadas con algún anticuerpo (**Fig.**

2.3A), corroborando que este anticuerpo impide la entrada del FCV a las células CrFK. Sin embargo, cuando las células fueron preincubadas con el anticuerpo anti-NCL a una dilución de 40 µg/ml (**Fig. 2.3A**), el CPE producido por FCV fue semejante al de las células que no fueron incubadas con algún anticuerpo. Un efecto citopático semejante al producido con las células que no fueron tratadas con anticuerpo, fue obtenido en las células que fueron incubadas con el anticuerpo no relacionado anti-IgG de conejo (40µg/ml y el suero preinmune de anti-JAM1 (dilución1:5), los cuales fueron usados como controles negativos (**Fig. 2.3A**). Cuando se analizaron los sobrenadantes de las células infectadas para evaluar el título viral mediante ensayos de plaqueo (**Fig. 2.3B**), se determinó que las células tratadas con el anticuerpo anti-JAM 1 presentaron una reducción en la producción viral, en comparación a la producción viral de las células infectadas y que no fueron incubadas con algún anticuerpo (**Fig. 2.3B**). La producción viral de las células infectadas y preincubadas con el anticuerpo anti-NCL, con el anticuerpo anti-IgG de conejo o con el suero preinmune de anti-JAM1, fue semejante a la de las células no pre incubadas con anticuerpos (**Fig. 2.3B**). Por otro lado el stock de FCV(MOI 0.01) fue pretratado con la proteínas FLrNCL (OriGene) o con la proteína BSA (bovine serum albumin) y no afectaron la infección del virus FCV a las células CrFK (**Fig. 2.3C**). Todos estos resultados en conjunto, demuestran que el anticuerpo anti-NCL y la proteína FL rNCL no inhiben la infección de FCV a las células CrFK, demostrando que la NCL expresada en la superficie de las CrFK no participa en la internalización del virus FCV.

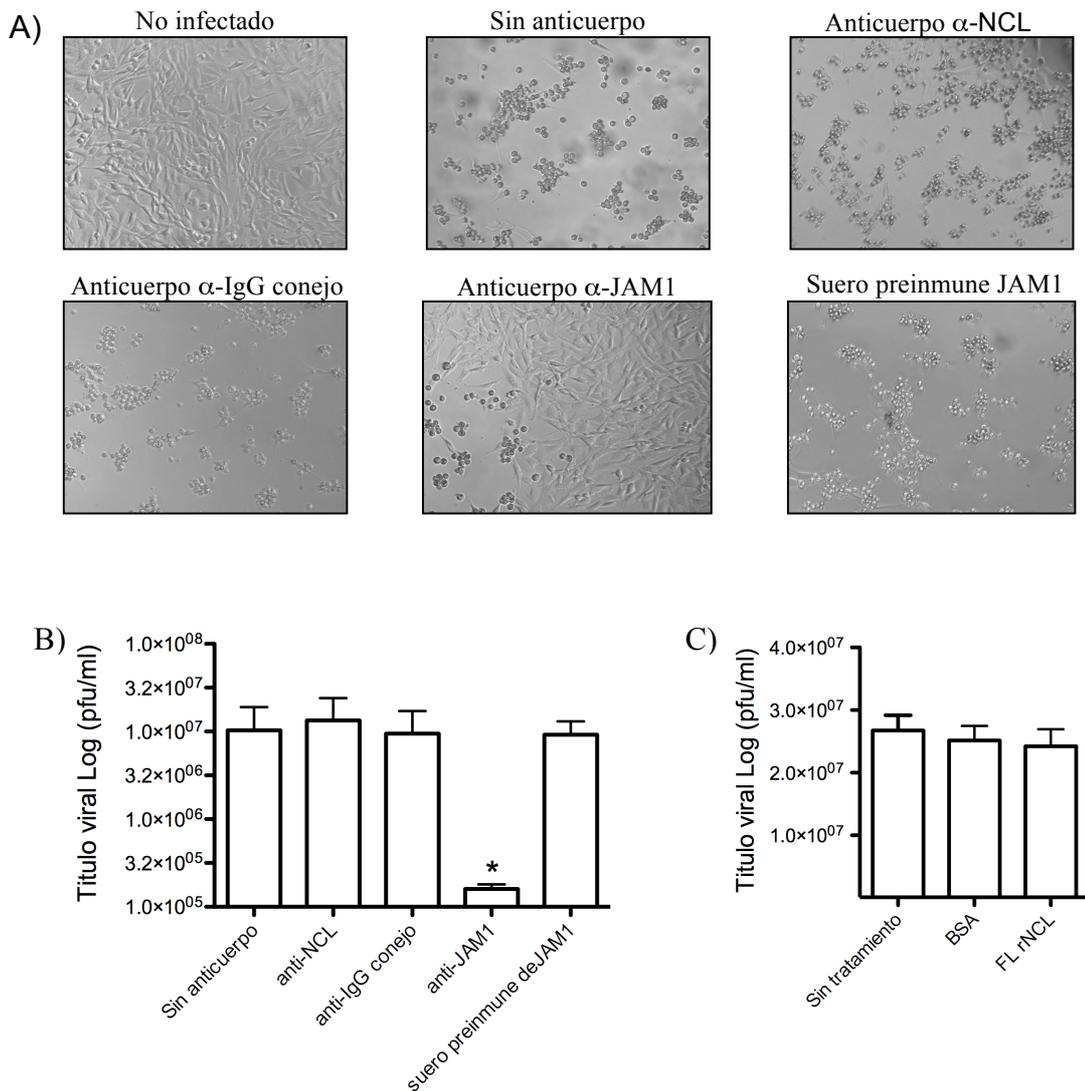


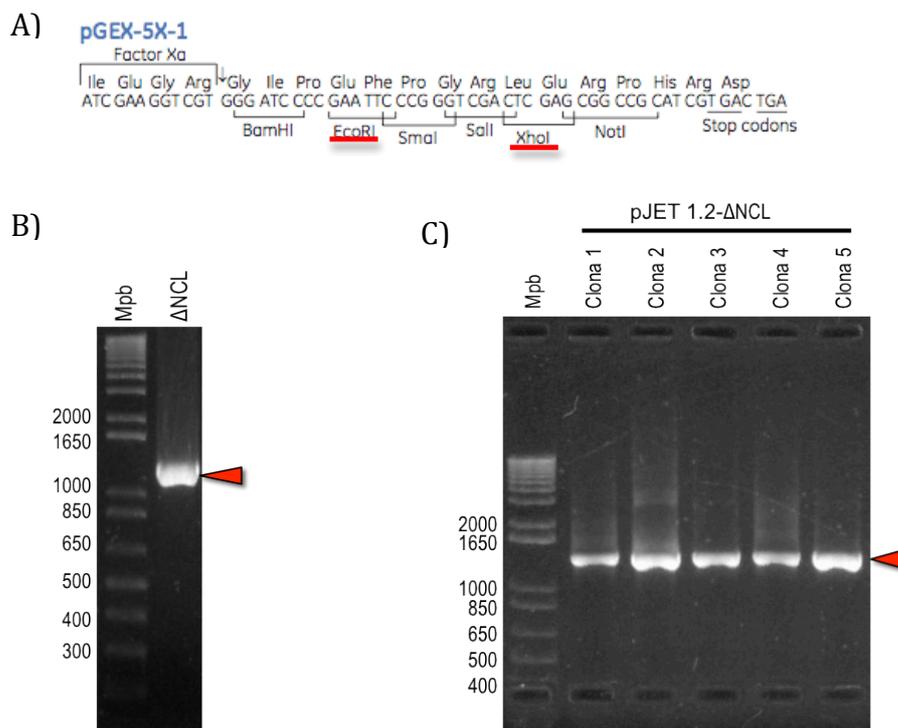
Figura 2.3. El anticuerpo anti-NCL no tiene efecto sobre la infección de FCV en las células CrFK. A) Células CrFK no tratadas (sin anticuerpo) y tratadas durante 1 h a 37°C con los anticuerpos anti-NCL, anti-IgG de conejo, anti-JAM-1, y el suero preinmune de JAM-1, fueron infectadas con FCV a una MOI de 0.01 durante 24 h. El efecto citopático se observó mediante microscopía de contraste de fases. Las células sin infectar se muestran en el primer panel. B) La gráfica de barras muestra el título viral de los sobrenadantes determinado mediante ensayos de plaqueo. C) El stock de FCV (0.01 MOI) fue preincubado con BSA o con FLrNCL, posteriormente fue adicionado o no (sin tratamiento) a las células CrFK y después de 24 horas, los sobrenadantes fueron recuperados, a los cuales se les determinó el título por ensayo de plaqueo. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Valor de $P < 0.05$ se indica (*).

Clonación, expresión y purificación de la proteína recombinante NCL truncada (Δ rNCL).

Dado que la NCL no participa en la unión e internalización del FCV a las células CrFK, era importante determinar su papel en subsecuentes eventos, como traducción y replicación del RNA viral del FCV. Para ello era necesario clonar, expresar y purificar a la proteína NCL. Sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible expresar la proteína completa en células procariontes²⁰⁴⁻²⁰⁶, por lo que se clonó, expresó y purificó una forma truncada de la NCL, a la cual denominamos Δ rNCL (**Fig. 3.3A**), que posee el dominio central, con las cuatro regiones de unión al RNA y el extremo C-terminal, pero carece del dominio N-terminal. La región que incluye el dominio central y C-terminal de la NCL, corresponde a un amplicón de 1233 pb (302 -707 aa) obtenido por RT-PCR a partir del RNA de células HeLa (**Fig. 2.4B**), el cual se clonó en el vector de tránsito pJET 1.2 (**Fig. 2.4C**). Las 5 colonias analizadas mediante PCR resultaron positivas (**Fig.2.4C**). Se realizó extracción de plásmido de las colonias 2 y 4, y se analizaron por restricción enzimática con las enzimas EcoRI y XhoI. Como se esperaba, tras la restricción, se liberó el inserto de 1233 pb que corresponde al tamaño del amplicón Δ NCL (**Fig. 2.4D**). El inserto liberado del vector pJET 1.2 se usó para la clonación en el vector de expresión PGEX 5X.1 (**Fig. 2.4A**). Una vez transformadas las células con las mezclas de ligación, se realizó PCR a 5 colonias candidatas, de las cuales 2 fueron positivas (colonia 4 y 5) (**Fig.2.4E**). A continuación se realizó la extracción de plásmido de las colonias 4 y 5, cuyos plásmidos fueron sujetos a digestión con las enzimas EcoRI y XhoI, los cuales liberaron el inserto correspondiente de 1233 pb (**Fig.2.4F**), corroborando de esta manera la clonación del amplicón de la Δ NCL en el vector de expresión PGEX

5X.1. La construcción denominada PGEX 5X.1- Δ NCL se mandó a secuenciar para corroborar que la proteína estuviera clonada en el lugar adecuado para ser expresada y que no contenía mutaciones en su secuencia.

Una vez corroborado que la secuencia de la Δ NCL estaba correcta, esta se expresó en bacterias y los extractos obtenidos se analizaron por SDS-PAGE en geles teñidos con azul de Coomassie (**Fig. 2.5**). Entre los extractos de bacterias no inducidas e inducidas se observó una banda diferencial a la altura del marcador de 71 KDa, a partir de las 2 horas, cuya expresión es muy semejante a las 3 y 4 horas de inducción. Esta banda corresponde al peso molecular esperado de la Δ NCL de alrededor de 45 KDa más el tag de GST de 26 KDa. Los resultados fueron similares para las dos clonas inducidas (**Fig. 2.5**). La proteína NCL truncada Δ rNCL se purificó (**Fig.2.6A**) y mediante Western-blot se corroboró la correcta expresión de la proteína usando el anticuerpo policlonal H-250, usando como control los extractos totales de CrFK (**Fig 2.6B**).



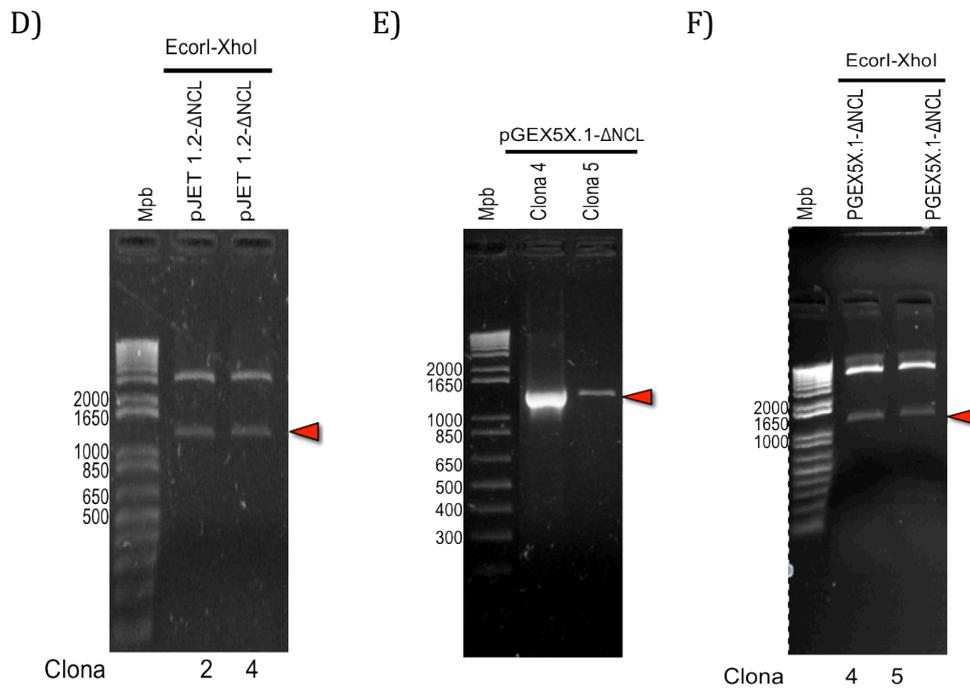


Figura 2.4. Clonación de la proteína truncada Δ -rNCL. A) Mapa del vector de expresión PGEX 5X.1, en rojo se subrayan los sitios de restricción que se usaron para clonar la proteína NCL truncada. B) PCR del amplicón de 1233 pb de la NCL de humano. C) PCR de colonia de 5 colonias transformadas con la reacción de ligación del producto de PCR en el vector de tránsito pJET 1.2 (clona1,2,3,4,5). D) Liberación del inserto Δ rNCL de 1233 pb del vector pJET 1.2 con la enzimas EcoRI y XhoI (Clona 2 y 4). E) PCR de colonia de 2 colonias, resultado de la clonación en el vector de expresión PGEX 5X.1. F) Liberación del inserto de 1233 pb del vector de expresión PGEX 5X.1 con la enzimas EcoRI y XhoI (Clona 4 y 5).

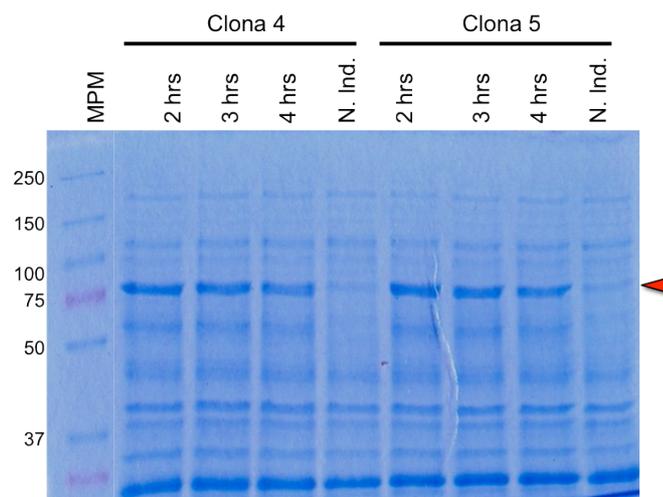


Figura 2.5. Expresión de la proteína truncada Δ -rNCL. Electroforesis y tinción con azul de Coomassie de los extractos proteicos no inducidos (N. Ind.) e inducidos con IPTG durante 2, 3 y 4 hrs a 37 °C, de las clonas 4 y 5. A la derecha de la figura se indica la presencia de una proteína diferencial de 75 kDa (flecha roja).

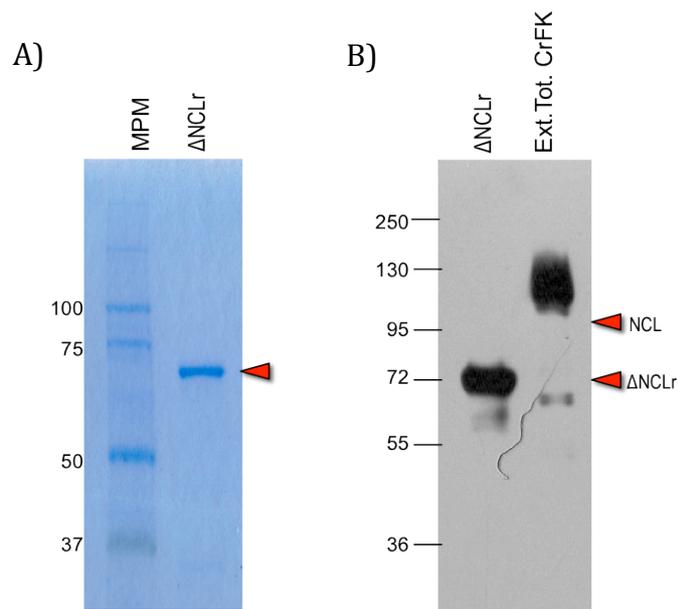
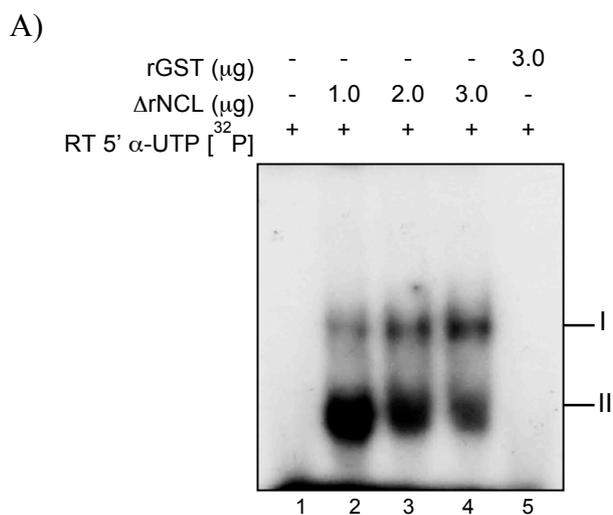


Figura 2.6. Purificación y Western-blot de la proteína truncada Δ -rNCL. A) La proteína Δ -rNCL fue purificada mediante agarosa acoplada a glutatión, dializada y analizada por SDS-PAGE en geles teñidos con azul de Coomassie B) Western-blot de la proteína truncada Δ -rNCL y de extractos totales de células CrFK, con el anticuerpo anti-NCL (H-250), cuyos pesos moleculares corresponden a los esperados.

La Δ -rNCL se une *in vitro* a las regiones terminales del RNA genómico del FCV.

El genoma de FCV posee secuencias y estructuras secundarias que son importantes para la unión de proteínas celulares y que son críticas para una traducción y replicación eficiente del RNA. Se ha reportado que la NCL juega un papel importante durante la traducción y replicación del RNA de diversos virus^{204,207}. Particularmente, por antecedentes de nuestro laboratorio, sabemos que la NCL esta presente en un complejo ribonucleoproteico (RNP) formado con la RNT3' del RNA de FCV²⁰³; sin embargo, no conocíamos si la NCL se unía directamente a este RNA y si también se unía a la RT 5'. Para determinar si la

NCL se unía al directamente con el extremo 5' y la RNT 3' del RNA de FCV, se realizó la síntesis *in vitro* de ambas regiones (la RT 5' correspondiente a los primeros 260 nt del genoma viral, y la RNT3' correspondiente a los últimos 76 nt del RNA de FCV). Los transcritos sintetizados con ³²P fueron interaccionados con la proteína recombinante ΔrNCL, y los complejos fueron analizados por EMSA (Fig. 2.7). La proteína ΔrNCL fue capaz de interaccionar de manera específica con la región RT 5' del RNA de FCV formando dos complejos, uno minoritario y con menor movilidad (I), y otro mayoritario con mayor movilidad (II), el cual se ve disminuido en presencia de concentraciones crecientes de la proteína recombinante ΔrNCL (Fig. 2.7A). Así mismo, la proteína ΔrNCL tuvo la capacidad de interactuar con la RNT 3' de FCV y formar un único complejo que se va incrementando en presencia de concentraciones crecientes de la proteína (Fig. 2.7A). Estos complejos formados con ambas regiones resultaron ser específicos ya que la proteína GST no formó ningún complejo con ninguna de las regiones previamente analizadas (Fig. 2.7A y B). Estos resultados indican que la proteína ΔrNCL se une de manera directa y específica a la RT 5' y a RNT 3' del RNA del FCV.



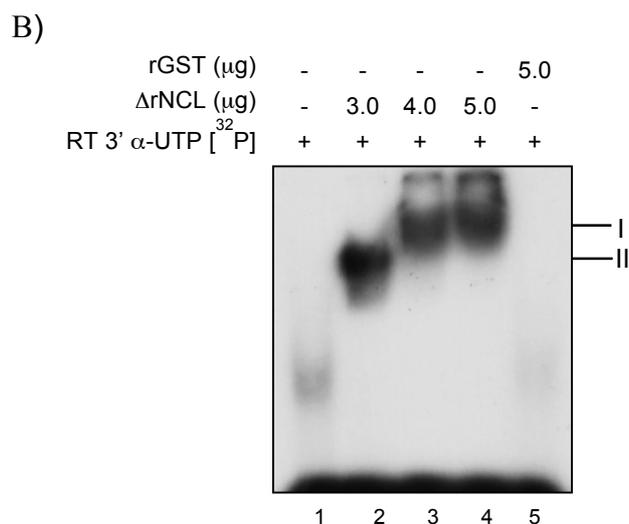


Figura 2.7. La NCL recombinante se une directamente a la RT 5' y a la RNT 3' del RNA del FCV. A) El RNA correspondiente a la RT 5' marcado con [α -³²P] UTP o con B) la RNT 3' DEL RNA genómico de FCV, se interaccionaron con concentraciones crecientes de la proteína recombinante de NCL (Δ rNCL), (carriles 2, 3 y 4 respectivamente), o con la proteína GST recombinante (carril 5). Carril 1: RNA libre. La migración de los complejos se indican como I y II.

La proteína NCL es requerida para una eficiente traducción *in vitro* del RNA de FCV.

Debido a que la NCL puede unirse de manera específica a ambas regiones terminales del RNA del FCV, era posible que la NCL pudiera estar jugando un papel importante en la traducción/replicación del RNA de FCV. En la actualidad no ha sido posible analizar estos procesos por separado en células infectadas, ya que son dependientes uno del otro. Sin embargo, para evaluar el proceso de traducción de manera independiente, se ha usado el sistema de traducción *in vitro*, por ello, para determinar el papel de la NCL en la traducción del RNA del FCV, se utilizó el sistema de lisado de reticulocitos de conejo (RRL). Se ha reportado previamente que este sistema permite la síntesis de proteínas del RNA de FCV^{90,156}, por esta razón era importante determinar la presencia de la NCL en los

lisados. Mediante ensayos tipo Western-blot con extractos de RRL, y un anticuerpo anti-NCL (donado por el Dr. Kurt Gustin, The University of Arizona), se determinó la presencia de la proteína NCL en estos lisados, como se había demostrado en previos reportes ¹⁷⁵(**Fig. 2.8A**). Estos anticuerpos también detectaron a la proteína recombinante Δ rNCL y a la proteína NCL presente en extractos de células CrFK (**Fig. 2.8 B y C**).

Una vez corroborado que la NCL estaba presente en los extractos de RRL, quisimos determinar si ésta tenía un efecto sobre la traducción, mediante ensayos de bloqueo y de reconstitución de NCL en los RRL. Una de las posibilidades para inhibir la actividad de la NCL de los RRL, era depletar esta proteína usando anticuerpos anti-NCL, pero usando esta metodología era posible que otras proteínas importantes para la traducción de FCV, pudieran también ser depletadas por su asociación con la NCL ²⁰⁸, lo que podría interferir con la interpretación de los resultados. Otra posibilidad era bloquear la actividad de la NCL de los RRL usando un ligando específico; es por ello que tratamos a los RRL con AGRO100, el cual es un aptámero que se une específicamente y con alta afinidad al C-terminal de la NCL bloqueando de esta manera su función ²⁰⁹⁻²¹¹. Cuando se realizaron ensayos de traducción *in vitro* con RRL pre-tratados con concentraciones crecientes de AGRO100 se generó inhibición en la síntesis de proteínas de FCV, de manera dosis dependiente (**Fig. 2.8B, carriles 3-7**); por otro lado, los RRL pre-tratados con oligo dT (moléculas heterólogas de DNA de cadena sencilla), no afectaron la síntesis de proteínas de FCV (**Fig. 2.8B, carril 8, Fig. 2.8C**), sugiriendo de esta forma que el bloqueo de la NCL por el AGRO100, era el responsable de la inhibición de la síntesis de proteínas virales de FCV.

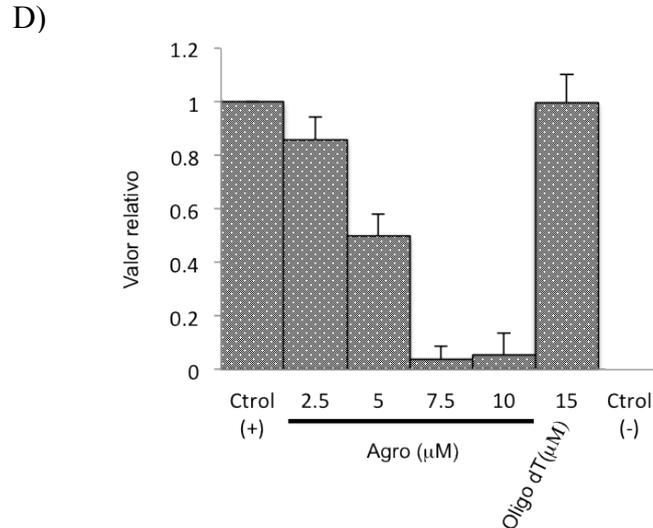
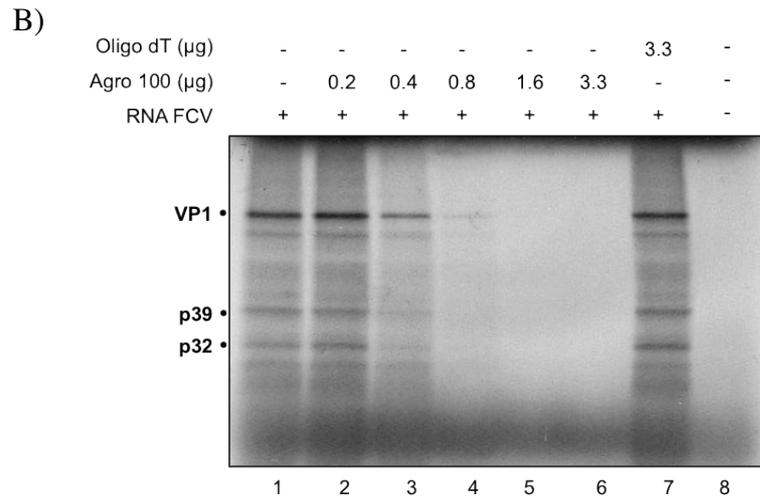
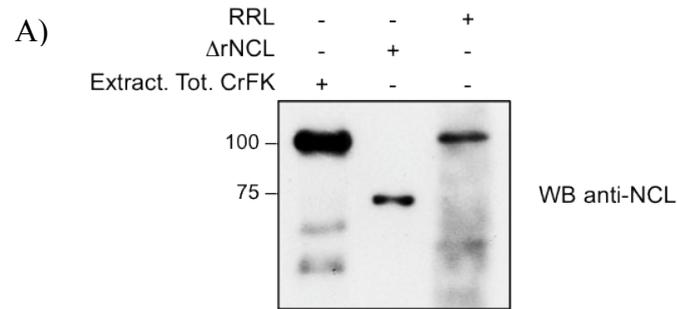


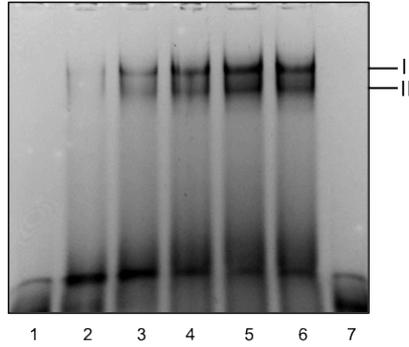
Fig. 2.8. El AGRO100 inhibe la traducción *in vitro* de FCV. A) Extractos totales de células CrFK, NCL recombinante (Δ rNCL), y extractos de RRL (carriles 1, 2 y 3 respectivamente), fueron analizados en gel electroforesis SDS-PAGE, y la NCL fue detectada mediante Western-blot usando un anticuerpo monoclonal. B) Traducción *in vitro* de FCV en extractos de RRL con metionina marcada con 35 S. Las proteínas virales fueron analizadas mediante gel de electroforesis SDS-PAGE en ausencia (carril 2) y presencia de concentraciones crecientes de AGRO100 (carril 3-7), u oligo dT (carril 8), usados como control de especificidad. C) La gráfica de barras expresada en porcentaje, representa el resultado de la cuantificación de la síntesis proteica de FCV con el software ImageJ, cuyos valores fueron normalizados con el control negativo (0 μ g AGRO100). Las desviaciones estándar representan las barras de error de tres experimentos independientes.

La proteína Δ rNCL se une específicamente al AGRO 100.

Para evaluar que el AGRO100 se une a la NCL, se usó AGRO100 acoplado al fluorocromo FITC (FITC-AGRO100) (Sigma-Aldrich) y la proteína Δ rNCL que contiene los cuatro dominios de unión a RNA, éstos se interaccionaron y los posibles complejos se analizaron mediante EMSA (**Fig. 2.9**). En presencia de $1\mu\text{g}$ de la proteína Δ rNCL se observa la formación de dos complejos, cuya intensidad se ve incrementada conforme se aumentó la concentración de la proteína Δ rNCL (**Fig. 2.9A, carriles 2-6**). Sin embargo, no se observa la formación de complejos cuando se interacciona la sonda FITC-AGRO100 con la proteína GST (**Fig. 2.9A, carril 7**), sugiriendo de esta manera que la interacción entre el AGRO100 y la proteína Δ rNCL es específica. Para confirmar especificidad de interacción entre AGRO-FITC y la Δ rNCL, se realizaron ensayos en presencia de concentraciones crecientes de un oligo homólogo (AGRO100 no marcado) o heterólogo (oligo-dT no marcado) (**Fig. 2.9B**). La adición de 30X y 60X de AGRO100 no marcado en la reacción, redujeron fuertemente la formación del complejo de FITC-AGRO- Δ rNCL, mientras que la adición de las mismas cantidades de oligo-dT no afectaron la formación del complejo (**Fig. 2.9B, carriles 3-4 y 5-6, respectivamente**), indicando que el AGRO100 se une de manera específica a la proteína Δ rNCL.

A)

rGST (μg)	-	-	-	-	-	-	5.0
ΔrNCL (μg)	-	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	-
FITC-Agro (μM)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5



B)

Oligo-dT	-	-	-	-	30X	60X
Agro	-	-	30X	60X	-	-
ΔrNCL (μg)	-	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
FITC-Agro (μM)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

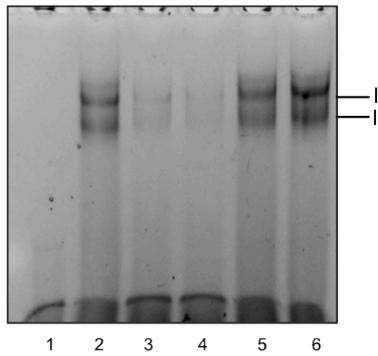


Fig.2.9. AGRO100 interacciona específicamente con la ΔrNCL . A) Se interaccionaron (1.5 μg) FITC- AGRO100 con concentraciones crecientes de ΔrNCL , (carriles 2-6), o con la proteína recombinante GST (carril 7). B) 2 μg de ΔrNCL (carriles 2-6), fueron interaccionados con 30X y 60X de AGRO100 no marcado (carriles 3 y 4 respectivamente), u oligo dT no marcado (carril 5 y 6 respectivamente), previo a la adición de 1.5 μg de FITC-AGRO100. Carril 1: RNA libre. La migración de los complejos se marca como I y II.

La NCL promueve la traducción *in vitro* del RNA de FCV y bloquea el efecto negativo del AGRO100.

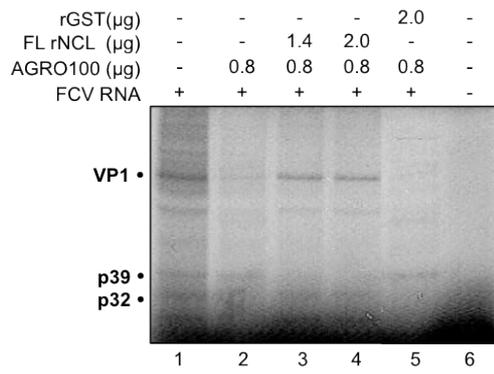
Después de haber confirmado que el AGRO100 se une de manera específica a la NCL y que inhibe la traducción *in vitro* del RNA de FCV en el sistema de RRL, quisimos determinar si la traducción podría ser restablecida en presencia de NCL. Para ello, una vez comprobado el efecto inhibitorio del AGRO 100 sobre la traducción del RNA del FCV en el sistema de RRL, se adicionó sobre estas mismas reacciones, concentraciones crecientes de las proteínas FLrNCL (OriGene) y Δ rNCL (**Fig. 3.0A y 3.0B**). La adición de 1.4 y 2.0 μ g de la proteína FLrNCL fue capaz de recuperar la síntesis de proteínas que se había inhibido por la presencia del AGRO100 en el sistema de traducción *in vitro* (**Fig. 3.0A**, carriles 3 y 4 respectivamente). La capacidad de la NCL de recuperar la traducción como único elemento adicionado en este sistema, sugiere fuertemente que esta proteína participa en la traducción *in vitro* del FCV. Sin embargo, las mismas cantidades de Δ rNCL (Fig. 7B, carriles 3 y 4) ó 2.0 μ g de la proteína GST (**Fig. 3.0A**, carril 5) fueron incapaces de compensar el efecto negativo del AGRO100. Dado que la proteína Δ rNCL no tuvo la capacidad de restablecer la traducción en presencia del AGRO100, como se observó con la FLrNCL, consideramos que la falta del extremo N-terminal o la ausencia de modificaciones post-traduccionales de la Δ rNCL, podrían ser los responsables de ésta incapacidad, así como se reportó para la traducción de poliovirus (PV) ²⁰⁴. Por ello, quisimos evaluar el efecto directo de las proteínas FLrNCL y Δ rNCL sobre la traducción *in vitro* del RNA de FCV. Al adicionar concentraciones crecientes de la proteína Δ rNCL al sistema de traducción *in vitro* del RNA de FCV se generó una reducción en la síntesis de proteínas del FCV (**Fig. 3.0C**, carriles 2-4), sin embargo, cuando se adicionaron

concentraciones crecientes de la proteína FLrNCL, la síntesis de proteína de FCV se promovió de manera dosis dependiente (**Fig. 3.0D**, carriles 2-4), confirmando de esta manera que la FLrNCL es un regulador positivo de la traducción *in vitro* del RNA de FCV.

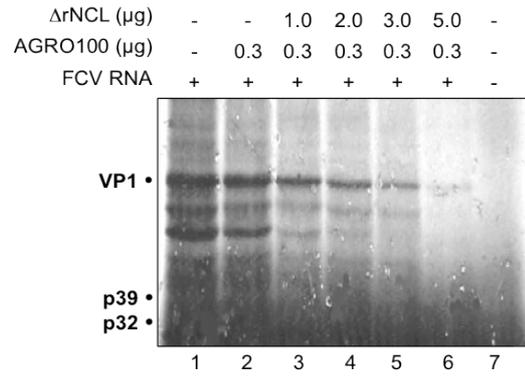
Experimentos en paralelo fueron realizados para determinar el efecto de la proteína Δ rNCL y de la FL rNCL en el sistema de traducción cap dependiente. La adición de concentraciones crecientes de Δ rNCL a la traducción *in vitro* del RNA capeado de GFP, generó una reducción en la síntesis proteica (**Fig. 3.0E**, carriles 2-4), mientras que concentraciones crecientes de la proteína FL rNCL promovió la síntesis proteica de manera dosis dependiente (**Fig. 3.0F**, carriles 2-4). Por otro lado, obtuvimos resultados semejantes cuando se uso el RNA capeado de Hsp70 (**Fig. 3.0G**, carriles 2-4). Dado que la proteína NCL es requerida también para la traducción IRES dependiente de PV y del Rhinovirus humano (HRV) ²⁰⁴ es posible que esta proteína pudiera ser un regulador positivo en el sistema de traducción *in vitro*.

Dado que la Δ rNCL tiene la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas del FCV, es posible que esta tenga una actividad de dominante negativa ²⁰⁴, la cual, por su capacidad de interactuar con el RNA del FCV impide la interacción de la NCL completa que si es funcional.

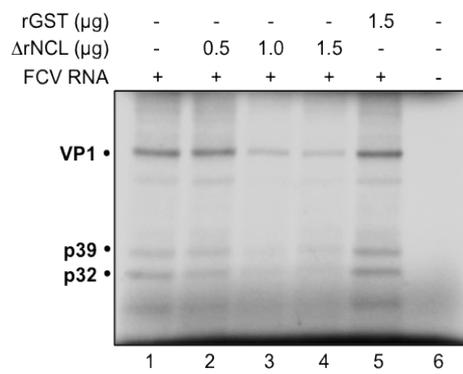
A)



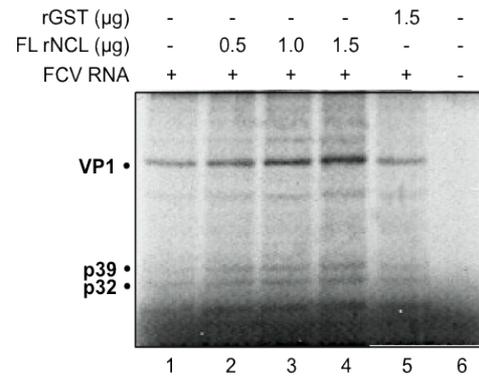
B)



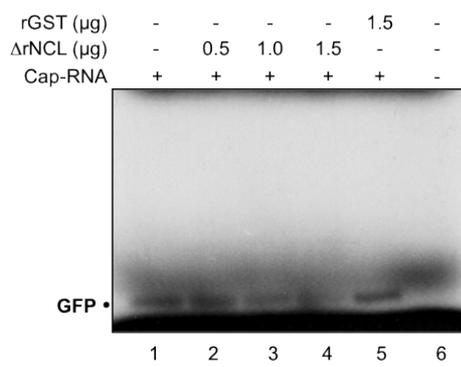
C)



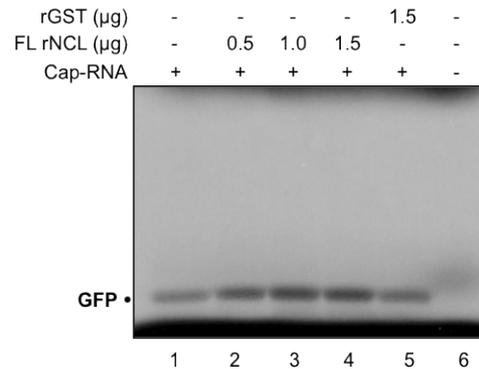
D)



E)



F)



G)

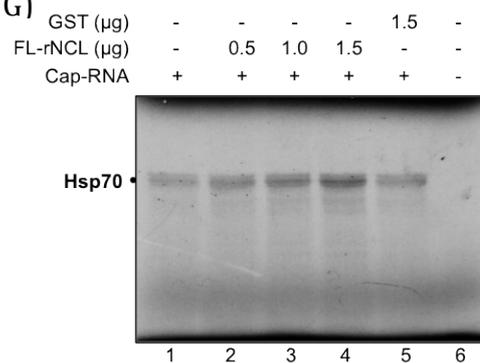


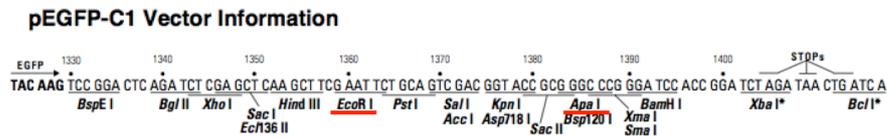
Fig. 3.0. La NCL completa pero no la NCL recombinante regula positivamente la traducción *in vitro* del FCV. La traducción *in vitro* fue realizada en extractos de RRL en presencia de metionina marcada con ³⁵S, en donde las proteínas virales sintetizadas *de novo* fueron analizadas por geles de poliacrilamida SDS-PAGE. A) En presencia de 0.8 µg de AGRO100 (carriles 2-6), y concentraciones crecientes de FLrNCL (carriles 3 y 4); B) En presencia de 0.8 µg de AGRO100 (carriles 2-7) y concentraciones crecientes de ΔrNCL (carriles 3 y 4) o ΔrNCL (carriles 5 y 6); C) En presencia de concentraciones crecientes de ΔrNCL (carriles 2-4); y D) En presencia de concentraciones crecientes de FLrNCL (carriles 2-4). E) RNA capeado de GFP en presencia de concentraciones crecientes de ΔrNCL (carriles 2-4); F) En presencia de concentraciones crecientes de FLrNCL (carriles 2-4) y G) RNA capeado de Hsp70 en presencia de concentraciones crecientes de FLrNCL.

Clonación de la secuencia truncada de la proteína NCL en un sistema de expresión eucariota (pEGFP-C1-ΔrNCL).

Para determinar si el N-terminal de la NCL era el responsable del efecto negativo en la síntesis *in vitro* de proteínas virales durante la infección con el FCV, era necesaria su expresión en células eucariotas. Para ello, la región de la nucleolina que incluye el dominio central y C-terminal de la NCL que corresponde a un amplicón de 1233 pb. (302 -707 aa) se clonó en el vector de expresión eucariote pEGFP-C1 en los sitios de restricción EcoRI y ApaI, señalados en el mapa (**Fig. 3.1A**). Se realizó RT-PCR a partir del RNA obtenido de células HeLa, correspondiente a la secuencia truncada de la NCL. El producto de PCR o amplicón obtenido, de 1233pb (**Fig. 3.1B**), se clonó directamente en el vector de tránsito pJET 1.2. Se analizaron 5 colonias mediante PCR, de las cuales todas fueron positivas para el tamaño del amplicón esperado (**Fig.3.1C**). Se realizó extracción de plásmido de la colonia 2 y 4, éstos plásmidos fueron sujetos a digestión con las enzimas EcoRI y ApaI y como se esperaba se liberó el inserto de 1233 pb (**Fig. 3.1D**). El inserto liberado del vector pJET 1.2 se usó para la clonación en el vector de expresión pEGFP-C1. Se realizó PCR de colonia, a 5

colonias, de las cuales 2 (colonia 4 y 5) fueron positivas para el amplicón del tamaño esperado (**Fig.3.1E**). Se realizó la extracción de plásmido de las colonias 4 y 5, y éstos fueron sujetos a digestión con las enzimas EcoRI y ApaI, los cuales liberaron el inserto de 1233 pb (**Fig.3.1F**), corroborando de esta manera la clonación del amplicón de la NCL truncada en el vector de expresión pEGFP-C1, cuya construcción se le denominó pEGFP-C1- Δ rNCL. El plásmido fue secuenciado para corroborar que este era susceptible de ser traducido correctamente y de producir una proteína sin mutaciones.

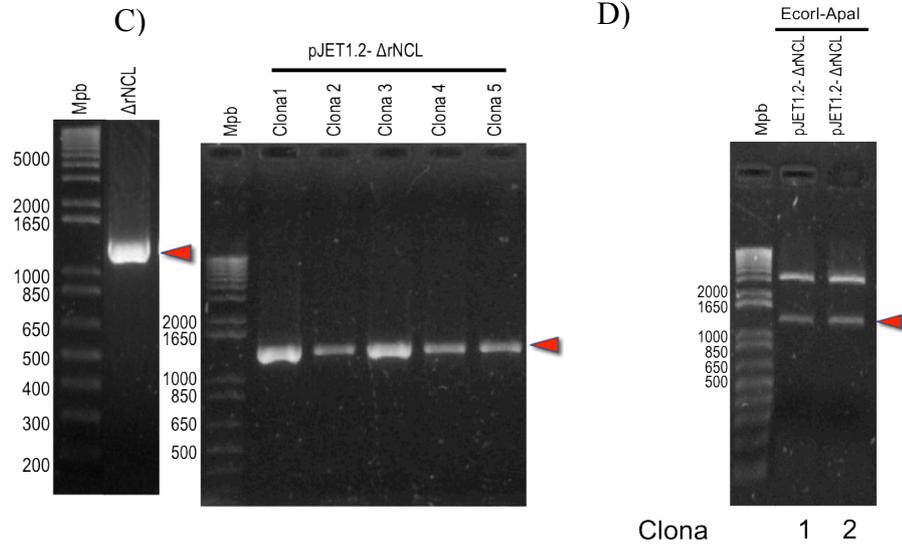
A)



B)

C)

D)



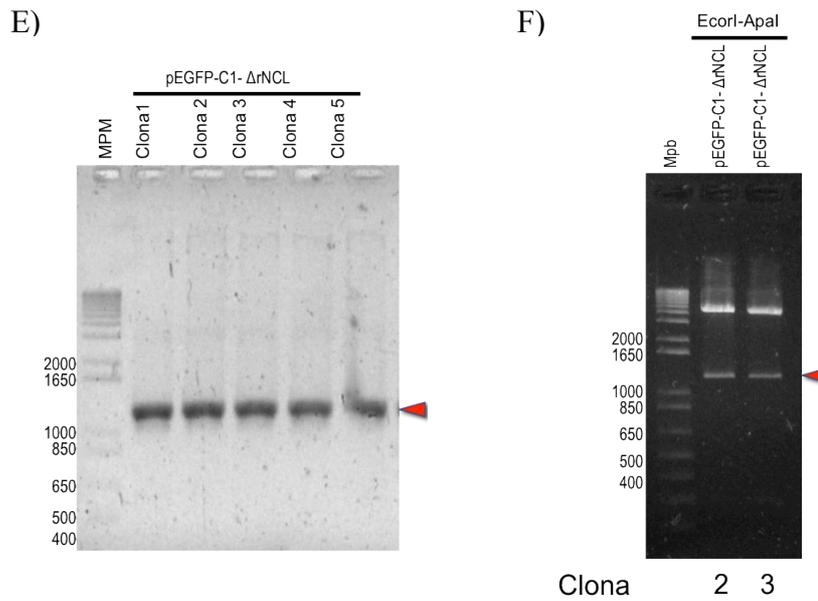


Fig. 3.1. Clonación de la NCL truncada en el vector pEGFP-C1(pEGFP-C1-rΔNCL). A) Mapa del vector de expresión pEGFP-C1, en rojo se subrayan los sitios de restricción que se usaron para clonar al amplicón que codifica a la proteína NCL truncada. B) PCR del amplicón de 1233 pb de la NCL de humano. C) PCR de colonia de 5 colonias transformadas con la reacción de ligación del producto de PCR en el vector de tránsito pJET1.2 (clona 1,2,3,4,5). D) Liberación del inserto Δ-rNCL de 1233 pb del vector pJET 1.2 con la enzimas EcoRI y ApaI (Clona 1 y 2). E) PCR de colonia de 2 colonias, resultado de la clonación en el vector de expresión pEGFP-C1. F) Liberación del inserto de 1233 pb del vector de expresión pEGFP-C1 con la enzimas EcoRI y ApaI (Clona 2 y 3).

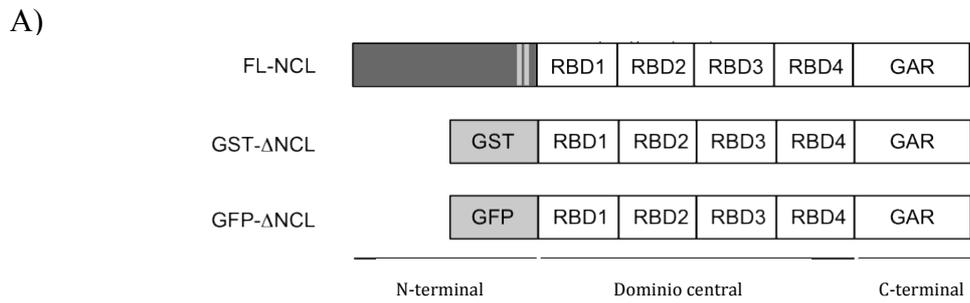
El dominio N-terminal de la NCL es requerido para una eficiente síntesis de proteínas y producción de partículas de FCV en células infectadas.

Las células CrFK fueron transfectadas establemente con la construcción pEGFP-C1-ΔrNCL, cuya construcción se esquematiza en la **Fig. 3.2A**. Mediante microscopía de fluorescencia, se observó que la GFP-ΔrNCL se distribuye mayoritariamente en el citoplasma, como era de esperarse, ya que carece de la secuencia de localización nuclear. Sin embargo, se observan pequeños puntos verdes en el núcleo que sugieren que podría haber cierta localización en los nucleolos (**Fig. 3.2B**, panel de la izquierda). La proteína GFP (vector vacío) se observó distribuida de manera homogénea en toda la célula (**Fig. 3.2B**, panel de la

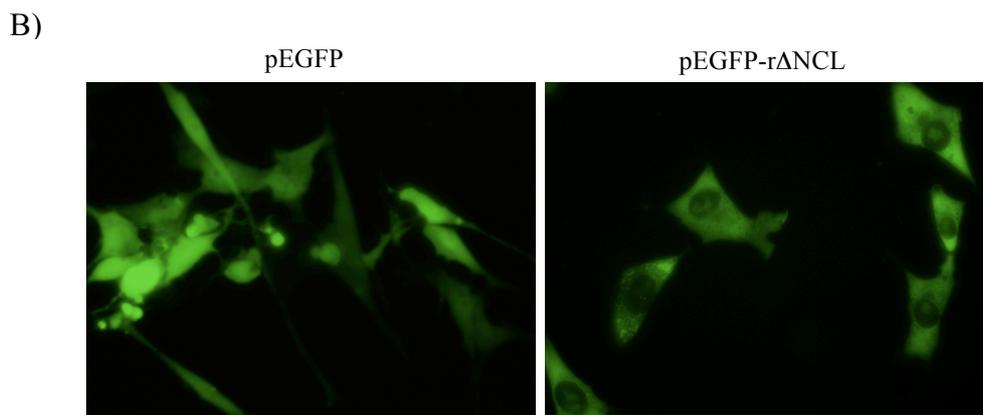
derecha). Para demostrar que la proteína GFP- Δ rNCL se expresaba en las células CrFK, se realizaron extractos totales de células CrFK no transfectadas (NT), transfectadas con el vector vacío pEGFP-C1 y transfectadas con la construcción pEGFP-C1- Δ rNCL; y mediante ensayos tipo Western-blot usando el anticuerpo H-250 se corroboró la presencia de la NCL endógena y de la proteína GFP- Δ rNCL (**Fig. 3.2C**). La presencia de la NCL endógena de alrededor de 110 kDa se observó en todas las condiciones (**Fig. 3.2C**, carril 1-6) sin embargo la presencia de la proteína de 71 kDa correspondiente a la proteína GFP- Δ rNCL se observó únicamente en las células transfectadas con la construcción pEGFP-C1- Δ rNCL (**Fig. 3.2C**, carril 3 y 6).

Después de determinar por microscopía y Western-blot que las células CrFK expresaban la proteína GFP y la proteína GFP- Δ rNCL (**Fig. 3.2B**), éstas y las células no transfectadas fueron infectadas con FCV a una MOI de 5, y después de 5 horas de infección, las células fueron cosechadas y se obtuvieron extractos de proteínas totales que se analizaron por SDS-PAGE para finalmente realizar ensayos tipo Western-blot (**Fig. 3.2C** y **3.2D**). Las células que expresan la proteína GFP- Δ rNCL, mostraron una reducción en la expresión de la proteína NS3 (**Fig. C**, carril 6 y **3.2D**), en comparación con la expresión de las células no transfectadas o transfectadas con el vector vacío e infectadas con FCV, las cuales mostraron niveles semejantes de expresión de la proteína NS3 (**Fig. 3.2C**, carril 4 y 5 respectivamente), sugiriendo que el N-terminal de la NCL es necesario para una eficiente síntesis de proteínas virales. Así mismo, cuando se evaluó la producción de partículas virales en el sobrenadante de las células que expresan a GFP- Δ rNCL (**Fig. 3.2E**) se observó una reducción de aproximadamente 2 log con

respecto a la cantidad de partículas virales del sobrenadante de las que células que expresaban GFP o que no fueron tratadas (**Fig. 3.2E**), sugiriendo fuertemente que la falta del dominio N-terminal de la NCL es responsable de la disminución en la síntesis de proteínas y producción de partículas virales en las células que expresan a la GFP- Δ rNCL.



- Señal de localización nuclear
- Dominio de unión a RNA
- Rico en Gly-Arg



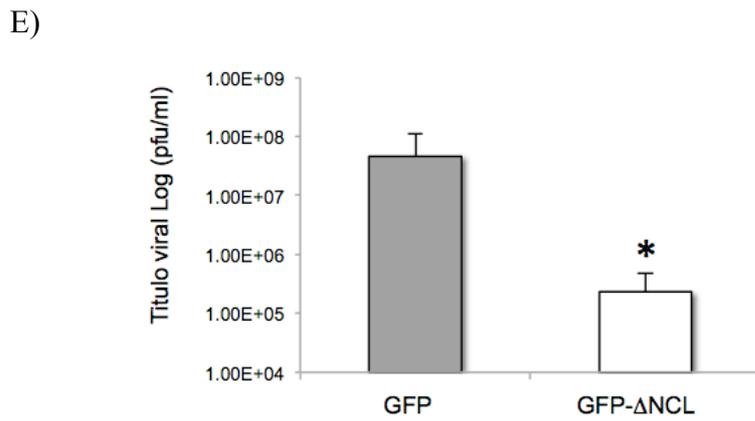
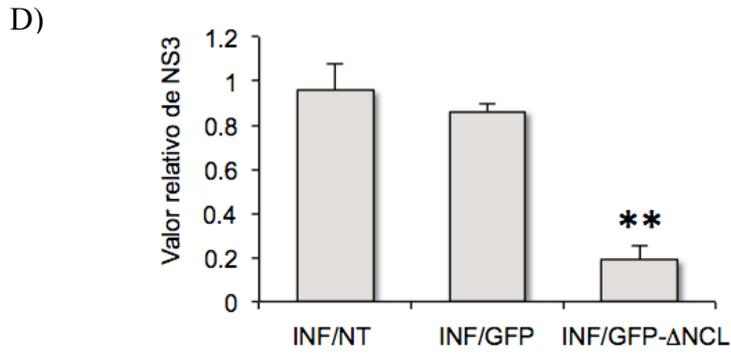
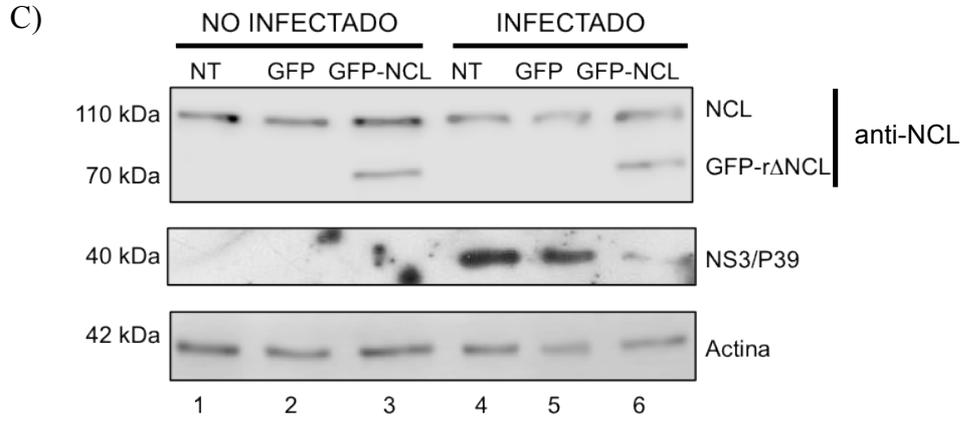


Fig. 3.2. La GFP- Δ rNCL genera disminución en la síntesis de proteínas virales y producción de partículas virales de FCV en las células CrFK. A) Representación esquemática de las proteínas FLrNCL, GST Δ rNCL y GFP Δ rNCL. Dominios de unión a RNA (RBD), señal de localización nuclear (NLS), y el dominio GAR (Arg-Gly-Gly). La proteína GST o GFP están localizadas en el N-terminal al final de la proteína Δ rNCL. B) Las células CrFK fueron transfectadas con el vector vacío (pEGFP) o con la construcción pEGFP-C1- Δ rNCL (GFP- Δ NCLr 302-707 aa). Las células que expresan GFP o GFP-rNCL se seleccionaron bajo antibiótico G418 y fueron observadas mediante microscopía de epifluorescencia. (C) Células CrFK no transfectadas (NT), y transfectadas con GFP o GFP-NCL fueron no infectadas (NI) (carriles 1, 2, y 3) o infectadas (INF) (carriles 4, 5, y 6) con FCV a una m.o.i de 5. Los lisados proteicos fueron obtenidos después de 5 h.p.i y la presencia de la NCL y la NS3 fue determinada mediante Western-blot usando anticuerpos específicos contra anti-NCL y anti-NS3. La actina fue usada como control de carga. D) La intensidad de la banda correspondiente a NS3 fue cuantificada mediante densitometría usando el software ImageJ y se expresó como un valor relativo con relación a los niveles de expresión de actina. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres experimentos independientes. El valor de $P < 0.01$ (**) se indica. E) La gráfica de barras representa el resultado de la titulación de los sobrenadantes colectados de las células infectadas y que expresan GFP o GFP-NCL. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Como parásitos intracelulares obligados, los virus modulan los procesos celulares para tener un eficiente ciclo replicativo; de tal manera que sus genomas y proteínas virales muchas veces interactúan con proteínas celulares para regular todos los procesos del ciclo replicativo ^{150,212}. En nuestro laboratorio reportamos que la proteína NCL se encuentra en complejos ribonucleoproteicos (RNP) formados con las regiones terminales del RNA del NV y el FCV; además mediante ensayos de silenciamiento de la NCL, se demostró que esta proteína es importante para que la síntesis de proteínas y producción de partículas de FCV sea eficiente, confirmando de ésta manera que la NCL es requerida en uno o varios procesos del ciclo replicativo de FCV ²⁰³.

Para determinar el papel preciso de la NCL en el ciclo replicativo del FCV, primero estudiamos su posible función durante la unión o internalización de la partícula viral. Aunque se conoce que la proteína JAM-1 ⁵⁹ y el ácido siálico $\alpha 2,6$ ¹²³ están involucrados en la unión del FCV a las células blanco, también se conoce que ciertas cepas del FCV utilizan otros receptores, por lo que era posible que la NCL pudiera estar participando como un receptor alternativo o co-receptor. A este respecto, es bien conocida la capacidad de la NCL de unirse a diferentes ligandos, incluyendo diferentes virus ^{179,213,214}. Por lo que en este trabajo, describimos por primera vez que la NCL se expresa en la superficie de las células CrFK. Sin embargo, por ensayos de bloqueo, determinamos que el anticuerpo anti-NCL, el cual ha sido usado para bloquear la unión e interacción de los virus HPIV-3 (Virus de la parainfluenza tipo 3) y RSV (Virus Sincitial Respiratorio) a las células de pulmón A549 y células 1HAEO-, respectivamente ^{179,214}, y el AGRO100

a las células MV4-11 ¹⁹³, no bloquea la unión y la internalización del FCV a las células CrFK, a diferencia de cuando las células se pre incubaron con el anticuerpo anti-JAM, en donde se observó una inhibición de la unión e infección significativa, indicando de esta manera que la NCL no participa en etapas tempranas del ciclo replicativo del FCV, y sugiriendo así mismo que podría estar involucrada en etapas posteriores a la entrada del virus a la célula, como la traducción o replicación del RNA viral.

En nuestro laboratorio se demostró que la NCL forma parte del complejo RNP de FCV ²⁰³, sin embargo, no se realizó la búsqueda de una interacción directa con el genoma, por lo que en este estudio determinamos si la NCL pudiera estar interaccionando con la RT 5' y la RNT 3'. Así, demostramos mediante ensayos de EMSA que la NCL puede unirse a ambas regiones del genoma del FCV. En conjunto, éstos resultados y los reportados previamente con el silenciamiento de la NCL ²⁰³, sugieren que la NCL podría estar participando en la traducción o replicación del RNA de FCV.

Se sabe que los procesos de traducción y replicación de los genomas de los virus de RNA de polaridad positiva son totalmente dependientes uno del otro, ya que su genoma es usado para ambos procesos; es por ello que nosotros decidimos estudiar el papel de la NCL en la traducción del RNA viral usando el sistema de RRL. Se ha reportado, que la traducción de los calicivirus es soportada por este sistema ^{90,156}; por esta razón, aunque ya se ha reportado que la NCL esta presente en los lisados de RRL ²¹⁵, era muy importante corroborarlo. Dada la presencia de la NCL en los extractos de RRL, una de las estrategias que quisimos utilizar para determinar su función en la traducción del FCV, fue depletar estos lisados de

NCL con anticuerpos específicos para NCL y determinar si la síntesis de proteínas virales ocurría. Sin embargo la depleción de la NCL podría conllevar a la pérdida de otras proteínas asociadas, las cuales quizás también son importantes para la síntesis de proteínas virales. Es por ello que se utilizó al aptámero AGRO100, el cual es un ligando específico de la NCL, que inactiva su función. La reducción en la síntesis de proteínas virales como consecuencia de la presencia del AGRO100 sugiere que la NCL, se requiere para la síntesis de proteínas virales de FCV. Esto se corroboró cuando se restableció la síntesis de proteínas virales, al adicionar concentraciones crecientes de la proteína FL rNCL, lo que confirma que la NCL promueve de manera positiva la síntesis de proteínas virales de FCV *in vitro*. Estos resultados y el efecto positivo dosis dependiente en la síntesis de proteínas virales de FCV cuando se adicionó al sistema de RRL concentraciones crecientes de la proteína FLrNCL confirman que la NCL esta involucrada en la traducción de FCV en los RRL. Un aspecto importante de la proteína Δ rNCL que hay que retomar, es que tiene la capacidad de unirse al RT 5' final y a la región RNT3' del RNA de FCV, sin embargo no restaura la traducción de FCV inhibida por AGRO 100. Más aún, la adición de la proteína Δ rNCL al sistema de RRL inhibió la síntesis de proteínas virales de FCV, sugiriendo que su efecto negativo podría estar dado por la carencia del dominio N-terminal o de las modificaciones post-traduccionales que el sistema procariota no ofrece. Sin embargo, la expresión de forma estable de la proteína GFP Δ rNCL en las células CrFK que proporcionó las modificaciones post-traduccionales, generó también la reducción en la expresión de la proteína NS3 producida durante la infección de FCV en las células CrFK, lo cual correlaciona con la disminución en la síntesis de proteína *in vitro* en presencia de la proteína NCL que carece del dominio N-terminal. Además, la

disminución de 2 log en la producción viral en células que expresan a la proteína Δ rNCL, correlaciona con la reducción de 1.5 log en el título viral obtenido de células que fueron silenciadas de NCL con un siRNA específico ²⁰³. Todos los resultados en conjunto sugieren fuertemente que la proteína Δ rNCL actúa como un regulador negativo, ya que podría estar compitiendo con la NCL endógena por el sitio de unión al RNA de FCV, de tal manera que la unión de Δ rNCL podría estar inhibiendo la formación de la maquinaria de traducción, dado que se ha reportado que el dominio N-terminal que esta ausente en ésta proteína está involucrada en interacciones proteína-proteína ²¹⁶. Al respecto, se ha demostrado que la NCL promueve la traducción IRES-dependiente de PV, tanto *in vitro* como *in vivo*; sin embargo la NCL recombinante que contiene el C-terminal y los dominios de unión a RNA pero que carece del dominio N-terminal, tiene la capacidad de inhibir la traducción IRES-dependiente de PV *in vitro*; ésta actividad inhibitoria correlaciona con su capacidad de unirse a la RNT 5' de PV ²⁰⁴. Por otro lado, la falta del dominio N-terminal de la proteína Δ rNCL podría evitar que ésta interaccione con otras proteínas que son necesarias para su función ^{159-161,217}. Con todos estos resultados, demostramos que la NCL participa en la traducción del FCV; sin embargo debido a que la proteína Δ rNCL también inhibió la síntesis dependiente de cap de la proteína GFP en el sistema de RRL, y que la adición de la proteína FLrNCL promovió la traducción de manera dosis dependiente de las proteínas GFP y Hsp70, es muy posible que la proteína NCL pudiera estar funcionando como un factor general de la traducción, esto es quizás por su capacidad de unirse a una gran variedad de mRNAs, así como se sugirió en previos estudios ²⁰⁴.

La NCL tiene la capacidad de unirse a elementos ricos en G que se encuentran localizados en regiones codificantes y no codificantes en diversos RNAm celulares que codifican para proteínas relacionadas al crecimiento celular y cáncer, promoviendo de ésta manera su sobreexpresión ¹⁷⁸. Aunque en algunos casos, la NCL promueve la traducción de algunos RNAm sin influir en su estabilidad ¹⁷⁸, en otros casos, puede diferencialmente regular tanto RNAs como proteínas ²¹⁶. La NCL tiene la capacidad de unirse a las RTs 5' y a la RNT 3' de diversos RNAm; en particular se ha reportado que la NCL tiene la capacidad de unirse la RNT 3' de la citosina CSF-1, para promover su deadenilación y de ésta manera disminuir las concentraciones del mRNA de CSF-1, sin embargo, también promueve la traducción de este mismo cuando se une a la proteína de unión a poly A (PABP), generando la circularización del RNAm de CSF-1 ²¹⁶. Se ha demostrado que la NCL se une al 5' del RNAm del colágeno $\alpha 1(I)$, siendo de ésta manera, uno de los factores proteicos que participan en su circularización; se propone que el objetivo de éste evento es estabilizar el RNAm relajando cualquier estructura secundaria que pudiera formarse en el extremo 5', por lo que su función sería de helicasa de RNA, haciendo de esta manera, accesible el codón de inicio a los ribosomas. Por otro lado, la proteína ribosomal L26 (RPL26) y la NCL participan en el control de la traducción de la proteína p53. En células que no se encuentran bajo estrés, la NCL reprime la traducción de la proteína p53, ya que se une al RNA de doble cadena que se forma por la interacción de las RNTs 5' y 3' del RNAm de p53. Los dominios de unión a RNA de la NCL (RBD) son los responsables de la homodimerización de ésta proteína, promoviendo así la estabilización del RNAm de p53. Cuando en la célula se genera daño al DNA, los dominios de unión a RNA de la NCL se encargan de reclutar a la proteína RPL26

a las mismas RNTs 5' y 3' del RNAm, generando el desensamble de los homodímeros de NCL para formar un heterodímero y promover la traducción del RNAm de p53. De tal manera que la disrupción del homodímero NCL-NCL por la proteína RPL26 podría ser la llave entre la represión y activación de la traducción de p53 después del estrés celular ²¹⁸.

La regulación de la traducción de la NCL en diversos casos esta determinado por su capacidad para interactuar con las regiones terminales de los RNAm, que algunas veces promueve la circularización de su RNA blanco, sola o como parte de un complejo proteico. La circularización de RNAm celulares se ha descubierto como una estrategia para una eficiente síntesis de proteínas, sin embargo, para los virus, las interacciones entre las regiones 5'-3' de los RNA genómicos, están involucrados en la replicación del RNA ²¹⁹⁻²²¹. En estudios previos reportamos que la NCL forma un complejo RNP con la RNT 3' y con la proteína NS6/7 viral, además, en este estudio, demostramos que la NCL interacciona de manera directa con la RT 5' y la RNT 3' del RNA de FCV, además de que juega el papel de regulador positivo de la traducción, es posible que pudiera estar involucrada en la circularización del RNA de FCV. Al respecto, existe evidencia de que los extremos 5'-3' de otros calicivirus como NV y MNV ^{151,155}, requieren de interacción RNA-RNA y cuya interacción es estabilizada por proteínas celulares, de las cuales la NCL podría ser una de ellas. Por otro lado, no descartamos aún la participación de esta proteína en otros procesos del ciclo replicativo del FCV como la replicación de RNA, por la interacción previamente demostrada que tiene con la región RNT 3' y con la NS6/7 como se demostró en previos estudios.

CONCLUSIONES

- ✚ La NCL no participa en la unión y entrada del FCV a las células CrFK.
- ✚ La Δ NCLr se une directamente a la RT 5' y a la RNT 3' del RNA de FCV.
- ✚ La FLrNCL modula positivamente la traducción *in vitro* del RNA del FCV.
- ✚ La Δ NCLr que carece del dominio N-terminal y NLS y que puede unirse al RNA del FCV modula negativamente la traducción *in vitro* del RNA del FCV.
- ✚ La GFP Δ rNCL modula negativamente la síntesis de proteínas virales, así como la producción de partículas virales de FCV en las células CrFK, lo cual sugiere fuertemente que el dominio N-terminal es importante para una eficiente replicación del FCV.

PERSPECTIVAS

- ✚ Determinar el papel de la NCL en la replicación del RNA viral y en la morfogénesis y/o salida del FCV de las células CrFK.
- ✚ Determinar los sitios específicos de unión de la NCL en el genoma del FCV.
- ✚ Mutar los sitios de unión de la NCL en el genoma de FCV usando el sistema de genética reversa de este virus, generar mutantes y caracterizarlas con el fin de obtener cepas vacunales.
- ✚ Determinar el dominio de unión de la NCL al genoma del virus FCV, realizando mutantes de la proteína NCL.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Liu, L. *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* **379**, 2151-2161, doi:10.1016/S0140-6736(12)60560-1 (2012).
- 2 Simmonds, P. *et al.* Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res* **36**, 2530-2546, doi:10.1093/nar/gkn096 (2008).
- 3 Olson, M. O. j. *The Nucleolus*. (Springer, 2011).
- 4 Alhatlani, B., Vashist, S. & Goodfellow, I. Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. *Virus Res* **206**, 134-143, doi:10.1016/j.virusres.2015.02.002 (2015).
- 5 Thorne, L. G. & Goodfellow, I. G. Norovirus gene expression and replication. *J Gen Virol* **95**, 278-291, doi:10.1099/vir.0.059634-0 (2014).
- 6 Patel, M. M. *et al.* Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* **14**, 1224-1231, doi:10.3201/eid1408.071114 (2008).
- 7 Liu, L. *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet* **385**, 430-440, doi:10.1016/S0140-6736(14)61698-6 (2015).
- 8 Plotkin, G. R., Kluge, R. M. & Waldman, R. H. Gastroenteritis: etiology, pathophysiology and clinical manifestations. *Medicine (Baltimore)* **58**, 95-114 (1979).
- 9 Guardiola-Rotger, A. *et al.* Studies on Diarrheal Diseases. The Multiplicity of Infectious Agents in the Intestinal Flora of Puerto Rican Children with Gastroenteritis. *J Pediatr* **65**, 81-91 (1964).
- 10 Glass, R. I. *et al.* Gastroenteritis viruses: an overview. *Novartis Found Symp* **238**, 5-19; discussion 19-25 (2001).
- 11 Wilhelmi de Cal, I., Mohedano del Pozo, R. B. & Sanchez-Fauquier, A. [Rotavirus and other viruses causing acute childhood gastroenteritis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **26 Suppl 13**, 61-65 (2008).
- 12 Wilhelmi, I., Roman, E. & Sanchez-Fauquier, A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* **9**, 247-262 (2003).
- 13 Hansman, G. S. *et al.* Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Clin Microbiol* **42**, 1305-1307 (2004).
- 14 Glass, R. I., Parashar, U. D. & Estes, M. K. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med* **361**, 1776-1785, doi:10.1056/NEJMra0804575 (2009).
- 15 Hansman, G. S. *et al.* Outbreak of gastroenteritis due to sapovirus. *J Clin Microbiol* **45**, 1347-1349, doi:10.1128/JCM.01854-06 (2007).
- 16 Ahmed, S. M. *et al.* Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **14**, 725-730, doi:10.1016/S1473-3099(14)70767-4 (2014).
- 17 Kapikian, A. Z. *et al.* Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* **10**, 1075-1081 (1972).

- 18 Peasey, A. E. *et al.* Seroepidemiology and risk factors for sporadic norovirus/Mexico strain. *J Infect Dis* **189**, 2027-2036, doi:10.1086/386310 (2004).
- 19 Gutierrez-Escolano, A. L. *et al.* Human caliciviruses detected in Mexican children admitted to hospital during 1998-2000, with severe acute gastroenteritis not due to other enteropathogens. *J Med Virol* **82**, 632-637, doi:10.1002/jmv.21743 (2010).
- 20 Koo, H. L. *et al.* Noroviruses as a cause of diarrhea in travelers to Guatemala, India, and Mexico. *J Clin Microbiol* **48**, 1673-1676, doi:10.1128/JCM.02072-09 (2010).
- 21 Estes, M. K., Prasad, B. V. & Atmar, R. L. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr Opin Infect Dis* **19**, 467-474, doi:10.1097/01.qco.0000244053.69253.3d (2006).
- 22 Wyatt, R. G. *et al.* Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis* **129**, 709-714 (1974).
- 23 Murata, T. *et al.* Prolonged norovirus shedding in infants \leq 6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* **26**, 46-49, doi:10.1097/01.inf.0000247102.04997.e0 (2007).
- 24 Gallimore, C. I. *et al.* Chronic excretion of a norovirus in a child with cartilage hair hypoplasia (CHH). *J Clin Virol* **30**, 196-204, doi:10.1016/j.jcv.2003.10.007 (2004).
- 25 Kirkwood, C. D. & Streitberg, R. Calicivirus shedding in children after recovery from diarrhoeal disease. *J Clin Virol* **43**, 346-348, doi:10.1016/j.jcv.2008.08.001 (2008).
- 26 Turcios-Ruiz, R. M. *et al.* Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit. *J Pediatr* **153**, 339-344, doi:10.1016/j.jpeds.2008.04.015 (2008).
- 27 Stuart, R. L. *et al.* An outbreak of necrotizing enterocolitis associated with norovirus genotype GII.3. *Pediatr Infect Dis J* **29**, 644-647 (2010).
- 28 Pelizzo, G. *et al.* Isolated colon ischemia with norovirus infection in preterm babies: a case series. *J Med Case Rep* **7**, 108, doi:10.1186/1752-1947-7-108 (2013).
- 29 Greig, J. D. & Lee, M. B. A review of nosocomial norovirus outbreaks: infection control interventions found effective. *Epidemiol Infect* **140**, 1151-1160, doi:10.1017/S0950268811002731 (2012).
- 30 Zingg, W., Colombo, C., Jucker, T., Bossart, W. & Ruef, C. Impact of an outbreak of norovirus infection on hospital resources. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26**, 263-267, doi:10.1086/502537 (2005).
- 31 Carling, P. C., Bruno-Murtha, L. A. & Griffiths, J. K. Cruise ship environmental hygiene and the risk of norovirus infection outbreaks: an objective assessment of 56 vessels over 3 years. *Clin Infect Dis* **49**, 1312-1317, doi:10.1086/606058 (2009).
- 32 Bartsch, S. M., Huang, S. S., Wong, K. F., Avery, T. R. & Lee, B. Y. The spread and control of norovirus outbreaks among hospitals in a region: a simulation model. *Open Forum Infect Dis* **1**, ofu030, doi:10.1093/ofid/ofu030 (2014).
- 33 Uchino, K. *et al.* Combined genogroup I and II norovirus infection at a nursery. *Jpn J Infect Dis* **59**, 270-272 (2006).

- 34 Love, S. S., Jiang, X., Barrett, E., Farkas, T. & Kelly, S. A large hotel outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis among three groups of guests and hotel employees in Virginia. *Epidemiol Infect* **129**, 127-132 (2002).
- 35 Domenech-Sanchez, A. Gastroenteritis outbreak caused by norovirus associated with the children's club of a hotel located in Majorca, Spain. *Clin Microbiol Infect* **17**, 949-951, doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03342.x (2011).
- 36 Zheng, D. P. *et al.* Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* **346**, 312-323, doi:10.1016/j.virol.2005.11.015 (2006).
- 37 Troeger, H. *et al.* Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. *Gut* **58**, 1070-1077, doi:10.1136/gut.2008.160150 (2009).
- 38 Schreiber, D. S., Blacklow, N. R. & Trier, J. S. The mucosal lesion of the proximal small intestine in acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *N Engl J Med* **288**, 1318-1323, doi:10.1056/NEJM197306212882503 (1973).
- 39 Souza, M., Azevedo, M. S., Jung, K., Cheetham, S. & Saif, L. J. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *J Virol* **82**, 1777-1786, doi:10.1128/JVI.01347-07 (2008).
- 40 Cheetham, S. *et al.* Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol* **80**, 10372-10381, doi:10.1128/JVI.00809-06 (2006).
- 41 Mumphrey, S. M. *et al.* Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. *J Virol* **81**, 3251-3263, doi:10.1128/JVI.02096-06 (2007).
- 42 Duizer, E. *et al.* Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* **85**, 79-87 (2004).
- 43 Bok, K. *et al.* Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 325-330, doi:10.1073/pnas.1014577107 (2011).
- 44 Farkas, T. Rhesus Enteric Calicivirus Surrogate Model for Human Norovirus Gastroenteritis. *J Gen Virol*, doi:10.1099/jgv.0.000020 (2014).
- 45 Cheetham, S. *et al.* Binding patterns of human norovirus-like particles to buccal and intestinal tissues of gnotobiotic pigs in relation to A/H histo-blood group antigen expression. *J Virol* **81**, 3535-3544, doi:10.1128/JVI.01306-06 (2007).
- 46 Souza, M., Cheetham, S. M., Azevedo, M. S., Costantini, V. & Saif, L. J. Cytokine and antibody responses in gnotobiotic pigs after infection with human norovirus genogroup II.4 (HS66 strain). *J Virol* **81**, 9183-9192, doi:10.1128/JVI.00558-07 (2007).
- 47 Jones, M. K. *et al.* Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* **346**, 755-759, doi:10.1126/science.1257147 (2014).
- 48 Wang, Q. H. *et al.* Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis* **11**, 1874-1881, doi:10.3201/eid1112.050485 (2005).

- 49 Bae, J. & Schwab, K. J. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Appl Environ Microbiol* **74**, 477-484, doi:10.1128/AEM.02095-06 (2008).
- 50 Vashist, S., Bailey, D., Putics, A. & Goodfellow, I. Model systems for the study of human norovirus Biology. *Future Virol* **4**, 353-367, doi:10.2217/fvl.09.18 (2009).
- 51 Wobus, C. E. *et al.* Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* **2**, e432, doi:10.1371/journal.pbio.0020432 (2004).
- 52 Chaudhry, Y., Skinner, M. A. & Goodfellow, I. G. Recovery of genetically defined murine norovirus in tissue culture by using a fowlpox virus expressing T7 RNA polymerase. *J Gen Virol* **88**, 2091-2100, doi:10.1099/vir.0.82940-0 (2007).
- 53 Arias, A., Urena, L., Thorne, L., Yunus, M. A. & Goodfellow, I. Reverse genetics mediated recovery of infectious murine norovirus. *J Vis Exp*, doi:10.3791/4145 (2012).
- 54 Ward, V. K. *et al.* Recovery of infectious murine norovirus using pol II-driven expression of full-length cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11050-11055, doi:10.1073/pnas.0700336104 (2007).
- 55 Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., King, A. D. & Green, K. Y. Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. *Virology* **353**, 463-473, doi:10.1016/j.virol.2006.06.006 (2006).
- 56 Sosnovtsev, S. & Green, K. Y. RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity. *Virology* **210**, 383-390, doi:10.1006/viro.1995.1354 (1995).
- 57 Chaudhry, Y. *et al.* Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J Biol Chem* **281**, 25315-25325, doi:10.1074/jbc.M602230200 (2006).
- 58 Willcocks, M. M., Carter, M. J. & Roberts, L. O. Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF4G and inhibition of host-cell protein synthesis during feline calicivirus infection. *J Gen Virol* **85**, 1125-1130 (2004).
- 59 Makino, A. *et al.* Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J Virol* **80**, 4482-4490, doi:10.1128/JVI.80.9.4482-4490.2006 (2006).
- 60 Bhella, D., Gatherer, D., Chaudhry, Y., Pink, R. & Goodfellow, I. G. Structural insights into calicivirus attachment and uncoating. *J Virol* **82**, 8051-8058, doi:10.1128/JVI.00550-08 (2008).
- 61 Karakasiliotis, I., Chaudhry, Y., Roberts, L. O. & Goodfellow, I. G. Feline calicivirus replication: requirement for polypyrimidine tract-binding protein is temperature-dependent. *J Gen Virol* **87**, 3339-3347, doi:10.1099/vir.0.82153-0 (2006).
- 62 Chen, R. *et al.* Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J Virol* **78**, 6469-6479, doi:10.1128/JVI.78.12.6469-6479.2004 (2004).
- 63 Prasad, B. V., Matson, D. O. & Smith, A. W. Three-dimensional structure of calicivirus. *J Mol Biol* **240**, 256-264, doi:10.1006/jmbi.1994.1439 (1994).

- 64 Sosnovtsev, S. V. & Green, K. Y. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology* **277**, 193-203, doi:10.1006/viro.2000.0579 (2000).
- 65 Herbert, T. P., Brierley, I. & Brown, T. D. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol* **78 (Pt 5)**, 1033-1040 (1997).
- 66 Liu, Y., Wimmer, E. & Paul, A. V. Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 495-517, doi:10.1016/j.bbagr.2009.09.007 (2009).
- 67 Gutierrez-Escolano, A. L., Brito, Z. U., del Angel, R. M. & Jiang, X. Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *J Virol* **74**, 8558-8562 (2000).
- 68 Hansman, G., X. Jiang, and K.Y. Green. *Calicivirus: Molecular and Cellular Virology.*, (2010).
- 69 Sosnovtsev, S. V., Garfield, M. & Green, K. Y. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J Virol* **76**, 7060-7072 (2002).
- 70 Carter, M. J. Feline calicivirus protein synthesis investigated by western blotting. *Arch Virol* **108**, 69-79 (1989).
- 71 Neill, J. D., Reardon, I. M. & Henrikson, R. L. Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. *J Virol* **65**, 5440-5447 (1991).
- 72 Sosnovtsev, S. V. *et al.* Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* **80**, 7816-7831, doi:10.1128/JVI.00532-06 (2006).
- 73 Hyde, J. L. & Mackenzie, J. M. Subcellular localization of the MNV-1 ORF1 proteins and their potential roles in the formation of the MNV-1 replication complex. *Virology* **406**, 138-148, doi:10.1016/j.virol.2010.06.047 (2010).
- 74 Hyde, J. L. *et al.* Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. *J Virol* **83**, 9709-9719, doi:10.1128/JVI.00600-09 (2009).
- 75 Bailey, D. *et al.* Feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation. *J Gen Virol* **91**, 739-749, doi:10.1099/vir.0.016279-0 (2010).
- 76 Ettayebi, K. & Hardy, M. E. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol* **77**, 11790-11797 (2003).
- 77 Fernandez-Vega, V. *et al.* Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol* **78**, 4827-4837 (2004).
- 78 Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V. & Wolf, Y. I. A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses. *FEBS Lett* **262**, 145-148 (1990).
- 79 Neill, J. D. Nucleotide sequence of a region of the feline calicivirus genome which encodes picornavirus-like RNA-dependent RNA polymerase, cysteine protease and 2C polypeptides. *Virus Res* **17**, 145-160 (1990).

- 80 Marin, M. S., Casais, R., Alonso, J. M. & Parra, F. ATP binding and ATPase activities associated with recombinant rabbit hemorrhagic disease virus 2C-like polypeptide. *J Virol* **74**, 10846-10851 (2000).
- 81 Pfister, T. & Wimmer, E. Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol* **75**, 1611-1619, doi:10.1128/JVI.75.4.1611-1619.2001 (2001).
- 82 Kaiser, W. J., Chaudhry, Y., Sosnovtsev, S. V. & Goodfellow, I. G. Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *J Gen Virol* **87**, 363-368, doi:10.1099/vir.0.81456-0 (2006).
- 83 Choe, S. S., Dodd, D. A. & Kirkegaard, K. Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology* **337**, 18-29, doi:10.1016/j.virol.2005.03.036 (2005).
- 84 Sharp, T. M., Guix, S., Katayama, K., Crawford, S. E. & Estes, M. K. Inhibition of cellular protein secretion by norwalk virus nonstructural protein p22 requires a mimic of an endoplasmic reticulum export signal. *PLoS One* **5**, e13130, doi:10.1371/journal.pone.0013130 (2010).
- 85 Lee, Y. F., Nomoto, A., Detjen, B. M. & Wimmer, E. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 59-63 (1977).
- 86 Burroughs, J. N. & Brown, F. Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *J Gen Virol* **41**, 443-446 (1978).
- 87 Dunham, D. M., Jiang, X., Berke, T., Smith, A. W. & Matson, D. O. Genomic mapping of a calicivirus VPg. *Arch Virol* **143**, 2421-2430 (1998).
- 88 Daughenbaugh, K. F., Wobus, C. E. & Hardy, M. E. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virol J* **3**, 33, doi:10.1186/1743-422X-3-33 (2006).
- 89 Daughenbaugh, K. F., Fraser, C. S., Hershey, J. W. & Hardy, M. E. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *Embo J* **22**, 2852-2859, doi:10.1093/emboj/cdg251 (2003).
- 90 Goodfellow, I. *et al.* Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep* **6**, 968-972, doi:10.1038/sj.embor.7400510 (2005).
- 91 Belliot, G. *et al.* In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol* **77**, 10957-10974 (2003).
- 92 Machin, A., Martin Alonso, J. M. & Parra, F. Identification of the amino acid residue involved in rabbit hemorrhagic disease virus VPg uridylylation. *J Biol Chem* **276**, 27787-27792, doi:10.1074/jbc.M100707200 (2001).
- 93 Rohayem, J., Robel, I., Jager, K., Scheffler, U. & Rudolph, W. Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *J Virol* **80**, 7060-7069, doi:10.1128/JVI.02195-05 (2006).
- 94 Morrow, C. D., Navab, M., Peterson, C., Hocko, J. & Dasgupta, A. Antibody to poliovirus genome-linked protein (VPg) precipitates in vitro synthesized RNA attached to VPg-precursor polypeptide(s). *Virus Res* **1**, 89-100 (1984).

- 95 Boniotti, B. *et al.* Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus. *J Virol* **68**, 6487-6495 (1994).
- 96 Jiang, X., Wang, M., Wang, K. & Estes, M. K. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology* **195**, 51-61, doi:10.1006/viro.1993.1345 (1993).
- 97 Blakeney, S. J., Cahill, A. & Reilly, P. A. Processing of Norwalk virus nonstructural proteins by a 3C-like cysteine proteinase. *Virology* **308**, 216-224 (2003).
- 98 Ye, S. *et al.* Identification and characterization of Iflavirus 3C-like protease processing activities. *Virology* **428**, 136-145, doi:10.1016/j.virol.2012.04.002 (2012).
- 99 Oka, T. *et al.* Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J Virol* **79**, 7283-7290, doi:10.1128/JVI.79.12.7283-7290.2005 (2005).
- 100 Sosnovtseva, S. A., Sosnovtsev, S. V. & Green, K. Y. Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J Virol* **73**, 6626-6633 (1999).
- 101 Someya, Y., Takeda, N. & Wakita, T. Saturation mutagenesis reveals that GLU54 of norovirus 3C-like protease is not essential for the proteolytic activity. *J Biochem* **144**, 771-780, doi:10.1093/jb/mvn130 (2008).
- 102 Sosnovtsev, S. V., Sosnovtseva, S. A. & Green, K. Y. Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J Virol* **72**, 3051-3059 (1998).
- 103 Joubert, P., Pautigny, C., Madelaine, M. F. & Rasschaert, D. Identification of a new cleavage site of the 3C-like protease of rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol* **81**, 481-488 (2000).
- 104 Liu, B. L., Viljoen, G. J., Clarke, I. N. & Lambden, P. R. Identification of further proteolytic cleavage sites in the Southampton calicivirus polyprotein by expression of the viral protease in *E. coli*. *J Gen Virol* **80** (Pt 2), 291-296 (1999).
- 105 Meyers, G., Wirblich, C., Thiel, H. J. & Thumfart, J. O. Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology* **276**, 349-363, doi:10.1006/viro.2000.0545 (2000).
- 106 Oka, T. *et al.* Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein. *J Gen Virol* **87**, 3329-3338, doi:10.1099/vir.0.81799-0 (2006).
- 107 Vazquez, A. L., Martin Alonso, J. M., Casais, R., Boga, J. A. & Parra, F. Expression of enzymatically active rabbit hemorrhagic disease virus RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Virol* **72**, 2999-3004 (1998).
- 108 Belliot, G. *et al.* Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **79**, 2393-2403, doi:10.1128/JVI.79.4.2393-2403.2005 (2005).
- 109 Fukushi, S. *et al.* Poly(A)- and primer-independent RNA polymerase of Norovirus. *J Virol* **78**, 3889-3896 (2004).
- 110 Vazquez, A. L., Alonso, J. M. & Parra, F. Mutation analysis of the GDD sequence motif of a calicivirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **74**, 3888-3891 (2000).

- 111 Wei, L. *et al.* Proteinase-polymerase precursor as the active form of feline calicivirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **75**, 1211-1219, doi:10.1128/JVI.75.3.1211-1219.2001 (2001).
- 112 Prasad, B. V. *et al.* X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* **286**, 287-290 (1999).
- 113 Ruvoen-Clouet, N., Ganiere, J. P., Andre-Fontaine, G., Blanchard, D. & Le Pendu, J. Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J Virol* **74**, 11950-11954 (2000).
- 114 Carter, M. J. *et al.* Identification and sequence determination of the capsid protein gene of feline calicivirus. *Arch Virol* **122**, 223-235 (1992).
- 115 Chang, K. O., George, D. W., Patton, J. B., Green, K. Y. & Sosnovtsev, S. V. Leader of the capsid protein in feline calicivirus promotes replication of Norwalk virus in cell culture. *J Virol* **82**, 9306-9317, doi:10.1128/JVI.00301-08 (2008).
- 116 Chang, K. O. Role of cholesterol pathways in norovirus replication. *J Virol* **83**, 8587-8595, doi:10.1128/JVI.00005-09 (2009).
- 117 Tohya, Y. *et al.* Analysis of the N-terminal polypeptide of the capsid precursor protein and the ORF3 product of feline calicivirus. *J Vet Med Sci* **61**, 1043-1047 (1999).
- 118 Seah, E. L., Marshall, J. A. & Wright, P. J. Open reading frame 1 of the Norwalk-like virus Camberwell: completion of sequence and expression in mammalian cells. *J Virol* **73**, 10531-10535 (1999).
- 119 Glass, P. J., Zeng, C. Q. & Estes, M. K. Two nonoverlapping domains on the Norwalk virus open reading frame 3 (ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions. *J Virol* **77**, 3569-3577 (2003).
- 120 Wirblich, C., Thiel, H. J. & Meyers, G. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *J Virol* **70**, 7974-7983 (1996).
- 121 Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S. E., Hutson, A. M. & Estes, M. K. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* **77**, 11603-11615 (2003).
- 122 Pesavento, P. A. *et al.* Distribution of the feline calicivirus receptor junctional adhesion molecule a in feline tissues. *Vet Pathol* **48**, 361-368, doi:10.1177/0300985810375245 (2011).
- 123 Stuart, A. D. & Brown, T. D. Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *J Gen Virol* **88**, 177-186, doi:10.1099/vir.0.82158-0 (2007).
- 124 Bhella, D. & Goodfellow, I. G. The cryo-electron microscopy structure of feline calicivirus bound to junctional adhesion molecule A at 9-angstrom resolution reveals receptor-induced flexibility and two distinct conformational changes in the capsid protein VP1. *J Virol* **85**, 11381-11390, doi:10.1128/JVI.05621-11 (2011).
- 125 Stuart, A. D. & Brown, T. D. Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *J Virol* **80**, 7500-7509, doi:10.1128/JVI.02452-05 (2006).
- 126 Firth, A. E. & Brierley, I. Non-canonical translation in RNA viruses. *J Gen Virol* **93**, 1385-1409, doi:10.1099/vir.0.042499-0 (2012).

- 127 Love, D. N. & Sabine, M. Electron microscopic observation of feline kidney cells infected with a feline calicivirus. *Arch Virol* **48**, 213-228 (1975).
- 128 Studdert, M. J. & O'Shea, J. D. Ultrastructural studies of the development of feline calicivirus in a feline embryo cell line. *Arch Virol* **48**, 317-325 (1975).
- 129 Green, K. Y. *et al.* Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells. *J Virol* **76**, 8582-8595 (2002).
- 130 Ahlquist, P. Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat Rev Microbiol* **4**, 371-382, doi:10.1038/nrmicro1389 (2006).
- 131 Li, Z. & Nagy, P. D. Diverse roles of host RNA binding proteins in RNA virus replication. *RNA Biol* **8**, 305-315 (2011).
- 132 Belliot, G., Sosnovtsev, S. V., Chang, K. O., McPhie, P. & Green, K. Y. Nucleotidylation of the VPg protein of a human norovirus by its proteinase-polymerase precursor protein. *Virology* **374**, 33-49, doi:10.1016/j.virol.2007.12.028 (2008).
- 133 Subba-Reddy, C. V., Yunus, M. A., Goodfellow, I. G. & Kao, C. C. Norovirus RNA synthesis is modulated by an interaction between the viral RNA-dependent RNA polymerase and the major capsid protein, VP1. *J Virol* **86**, 10138-10149, doi:10.1128/JVI.01208-12 (2012).
- 134 Subba-Reddy, C. V., Goodfellow, I. & Kao, C. C. VPg-primed RNA synthesis of norovirus RNA-dependent RNA polymerases by using a novel cell-based assay. *J Virol* **85**, 13027-13037, doi:10.1128/JVI.06191-11 (2011).
- 135 Sit, T. L., Vaewhongs, A. A. & Lommel, S. A. RNA-mediated trans-activation of transcription from a viral RNA. *Science* **281**, 829-832 (1998).
- 136 Sivakumaran, K., Choi, S. K., Hema, M. & Kao, C. C. Requirements for brome mosaic virus subgenomic RNA synthesis in vivo and replicase-core promoter interactions in vitro. *J Virol* **78**, 6091-6101, doi:10.1128/JVI.78.12.6091-6101.2004 (2004).
- 137 Jiang, X., Wang, M., Graham, D. Y. & Estes, M. K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* **66**, 6527-6532 (1992).
- 138 Tan, M. *et al.* Noroviral P particle: structure, function and applications in virus-host interaction. *Virology* **382**, 115-123, doi:10.1016/j.virol.2008.08.047 (2008).
- 139 Neill, J. D. The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection. *Virus Res* **87**, 89-93 (2002).
- 140 José Molina López, M. E. M. Z. y. J. t. Z. *MICROBIOLOGÍA. BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA*. First edn, (2010).
- 141 Asanaka, M. *et al.* Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10327-10332, doi:10.1073/pnas.0408529102 (2005).
- 142 Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K. O., Onwudiwe, O. & Green, K. Y. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol* **79**, 4012-4024, doi:10.1128/JVI.79.7.4012-4024.2005 (2005).

- 143 Natoni, A., Kass, G. E., Carter, M. J. & Roberts, L. O. The mitochondrial pathway of apoptosis is triggered during feline calicivirus infection. *J Gen Virol* **87**, 357-361, doi:10.1099/vir.0.81399-0 (2006).
- 144 Roberts, L. O., Al-Molawi, N., Carter, M. J. & Kass, G. E. Apoptosis in cultured cells infected with feline calicivirus. *Ann N Y Acad Sci* **1010**, 587-590 (2003).
- 145 Sosnovtsev, S. V., Prikhod'ko, E. A., Belliot, G., Cohen, J. I. & Green, K. Y. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Res* **94**, 1-10 (2003).
- 146 Nagy, P. D. & Pogany, J. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat Rev Microbiol* **10**, 137-149, doi:10.1038/nrmicro2692 (2012).
- 147 Miller, S. & Krijnse-Locker, J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* **6**, 363-374, doi:10.1038/nrmicro1890 (2008).
- 148 Agol, V. I. & Gmyl, A. P. Viral security proteins: counteracting host defences. *Nat Rev Microbiol* **8**, 867-878, doi:10.1038/nrmicro2452 (2010).
- 149 Vidalain, P. O. & Tangy, F. Virus-host protein interactions in RNA viruses. *Microbes Infect* **12**, 1134-1143, doi:10.1016/j.micinf.2010.09.001 (2010).
- 150 Ahlquist, P., Noueir, A. O., Lee, W. M., Kushner, D. B. & Dye, B. T. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* **77**, 8181-8186 (2003).
- 151 Sandoval-Jaime, C. & Gutierrez-Escolano, A. L. Cellular proteins mediate 5'-3' end contacts of Norwalk virus genomic RNA. *Virology* **387**, 322-330, doi:10.1016/j.virol.2009.02.041 (2009).
- 152 Bailey, D. *et al.* Functional analysis of RNA structures present at the 3' extremity of the murine norovirus genome: the variable polypyrimidine tract plays a role in viral virulence. *J Virol* **84**, 2859-2870, doi:10.1128/JVI.02053-09 (2010).
- 153 Vashist, S., Urena, L., Chaudhry, Y. & Goodfellow, I. Identification of RNA-protein interaction networks involved in the norovirus life cycle. *J Virol* **86**, 11977-11990, doi:10.1128/JVI.00432-12 (2012).
- 154 Gutierrez-Escolano, A. L., Vazquez-Ochoa, M., Escobar-Herrera, J. & Hernandez-Acosta, J. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem Biophys Res Commun* **311**, 759-766 (2003).
- 155 Lopez-Manriquez, E. *et al.* Norovirus genome circularization and efficient replication are facilitated by binding of PCBP2 and hnRNP A1. *J Virol* **87**, 11371-11387, doi:10.1128/JVI.03433-12 (2013).
- 156 Karakasiliotis, I. *et al.* Polypyrimidine tract binding protein functions as a negative regulator of feline calicivirus translation. *PLoS One* **5**, e9562, doi:10.1371/journal.pone.0009562 (2010).
- 157 Srivastava, M. & Pollard, H. B. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *Faseb J* **13**, 1911-1922 (1999).
- 158 Lapeyre, B., Caizergues-Ferrer, M., Bouche, G. & Amalric, F. Cloning of cDNA encoding a 100 kDa nucleolar protein (nucleoline) of Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Res* **13**, 5805-5816 (1985).
- 159 Erard, M. S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A. & Amalric, F. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin

- decondensation by binding to histone H1. *Eur J Biochem* **175**, 525-530 (1988).
- 160 Ginisty, H., Amalric, F. & Bouvet, P. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *Embo J* **17**, 1476-1486, doi:10.1093/emboj/17.5.1476 (1998).
- 161 Bouvet, P., Diaz, J. J., Kindbeiter, K., Madjar, J. J. & Amalric, F. Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J Biol Chem* **273**, 19025-19029 (1998).
- 162 Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. & Bouvet, P. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* **112 (Pt 6)**, 761-772 (1999).
- 163 Mongelard, F. & Bouvet, P. Nucleolin: a multiFACeTed protein. *Trends Cell Biol* **17**, 80-86, doi:10.1016/j.tcb.2006.11.010 (2007).
- 164 Ghisolfi, L., Kharrat, A., Joseph, G., Amalric, F. & Erard, M. Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA. *Eur J Biochem* **209**, 541-548 (1992).
- 165 Serin, G. *et al.* Localization of nucleolin binding sites on human and mouse pre-ribosomal RNA. *Biochimie* **78**, 530-538 (1996).
- 166 Ghisolfi-Nieto, L., Joseph, G., Puvion-Dutilleul, F., Amalric, F. & Bouvet, P. Nucleolin is a sequence-specific RNA-binding protein: characterization of targets on pre-ribosomal RNA. *J Mol Biol* **260**, 34-53, doi:10.1006/jmbi.1996.0380 (1996).
- 167 Ishikawa, F., Matunis, M. J., Dreyfuss, G. & Cech, T. R. Nuclear proteins that bind the pre-mRNA 3' splice site sequence r(UUAG/G) and the human telomeric DNA sequence d(TTAGGG)_n. *Mol Cell Biol* **13**, 4301-4310 (1993).
- 168 Zaidi, S. H. & Malter, J. S. Nucleolin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins specifically interact with the 3'-untranslated region of amyloid protein precursor mRNA. *J Biol Chem* **270**, 17292-17298 (1995).
- 169 Bogre, L. *et al.* Developmental and cell cycle regulation of alfalfa nucMsl1, a plant homolog of the yeast Nsr1 and mammalian nucleolin. *Plant Cell* **8**, 417-428 (1996).
- 170 Roger, B., Moisand, A., Amalric, F. & Bouvet, P. Repression of RNA polymerase I transcription by nucleolin is independent of the RNA sequence that is transcribed. *J Biol Chem* **277**, 10209-10219, doi:10.1074/jbc.M106412200 (2002).
- 171 Daniely, Y., Dimitrova, D. D. & Borowiec, J. A. Stress-dependent nucleolin mobilization mediated by p53-nucleolin complex formation. *Mol Cell Biol* **22**, 6014-6022 (2002).
- 172 Hovanessian, A. G. *et al.* The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* **261**, 312-328, doi:10.1006/excr.2000.5071 (2000).
- 173 Jiang, Y., Xu, X. S. & Russell, J. E. A nucleolin-binding 3' untranslated region element stabilizes beta-globin mRNA in vivo. *Mol Cell Biol* **26**, 2419-2429, doi:10.1128/MCB.26.6.2419-2429.2006 (2006).
- 174 Sengupta, T. K., Bandyopadhyay, S., Fernandes, D. J. & Spicer, E. K. Identification of nucleolin as an AU-rich element binding protein involved in bcl-2 mRNA stabilization. *J Biol Chem* **279**, 10855-10863, doi:10.1074/jbc.M309111200 (2004).

- 175 Rajagopalan, L. E., Westmark, C. J., Jarzembowski, J. A. & Malter, J. S. hnRNP C increases amyloid precursor protein (APP) production by stabilizing APP mRNA. *Nucleic Acids Res* **26**, 3418-3423 (1998).
- 176 Chen, C. Y. *et al.* Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev* **14**, 1236-1248 (2000).
- 177 Bunimov, N., Smith, J. E., Gosselin, D. & Laneuville, O. Translational regulation of PGHS-1 mRNA: 5' untranslated region and first two exons conferring negative regulation. *Biochim Biophys Acta* **1769**, 92-105, doi:10.1016/j.bbaexp.2007.01.004 (2007).
- 178 Abdelmohsen, K. *et al.* Enhanced translation by Nucleolin via G-rich elements in coding and non-coding regions of target mRNAs. *Nucleic Acids Res* **39**, 8513-8530, doi:10.1093/nar/gkr488 (2011).
- 179 Bose, S., Basu, M. & Banerjee, A. K. Role of nucleolin in human parainfluenza virus type 3 infection of human lung epithelial cells. *J Virol* **78**, 8146-8158, doi:10.1128/JVI.78.15.8146-8158.2004 (2004).
- 180 Kim, S. K. & Srivastava, M. Stability of Nucleolin protein as the basis for the differential expression of Nucleolin mRNA and protein during serum starvation. *DNA Cell Biol* **22**, 171-178, doi:10.1089/104454903321655792 (2003).
- 181 Legrand, D. *et al.* Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. *Eur J Biochem* **271**, 303-317 (2004).
- 182 Said, E. A. *et al.* Pleiotrophin inhibits HIV infection by binding the cell surface-expressed nucleolin. *Febs J* **272**, 4646-4659, doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04870.x (2005).
- 183 Kadomatsu, K. & Muramatsu, T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett* **204**, 127-143, doi:10.1016/S0304-3835(03)00450-6 (2004).
- 184 Perez-Pinera, P., Berenson, J. R. & Deuel, T. F. Pleiotrophin, a multifunctional angiogenic factor: mechanisms and pathways in normal and pathological angiogenesis. *Curr Opin Hematol* **15**, 210-214, doi:10.1097/MOH.0b013e3282fdc69e (2008).
- 185 Kleinman, H. K. *et al.* Identification of a 110-kDa nonintegrin cell surface laminin-binding protein which recognizes an A chain neurite-promoting peptide. *Arch Biochem Biophys* **290**, 320-325 (1991).
- 186 Turck, N. *et al.* Effect of laminin-1 on intestinal cell differentiation involves inhibition of nuclear nucleolin. *J Cell Physiol* **206**, 545-555, doi:10.1002/jcp.20501 (2006).
- 187 Larrucea, S. *et al.* Cellular adhesion mediated by factor J, a complement inhibitor. Evidence for nucleolin involvement. *J Biol Chem* **273**, 31718-31725 (1998).
- 188 Harms, G. *et al.* Identification of nucleolin as a new L-selectin ligand. *Biochem J* **360**, 531-538 (2001).
- 189 Reyes-Reyes, E. M. & Akiyama, S. K. Cell-surface nucleolin is a signal transducing P-selectin binding protein for human colon carcinoma cells. *Exp Cell Res* **314**, 2212-2223, doi:10.1016/j.yexcr.2008.03.016 (2008).
- 190 Tate, A. *et al.* Met-Independent Hepatocyte Growth Factor-mediated regulation of cell adhesion in human prostate cancer cells. *BMC Cancer* **6**, 197, doi:10.1186/1471-2407-6-197 (2006).

- 191 Xu, X. *et al.* Inhibition of DNA replication and induction of S phase cell cycle arrest by G-rich oligonucleotides. *J Biol Chem* **276**, 43221-43230, doi:10.1074/jbc.M104446200 (2001).
- 192 Bates, P. J., Laber, D. A., Miller, D. M., Thomas, S. D. & Trent, J. O. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Pathol* **86**, 151-164, doi:10.1016/j.yexmp.2009.01.004 (2009).
- 193 Soundararajan, S. *et al.* Plasma membrane nucleolin is a receptor for the anticancer aptamer AS1411 in MV4-11 leukemia cells. *Mol Pharmacol* **76**, 984-991, doi:10.1124/mol.109.055947 (2009).
- 194 Bates, P. J., Kahlon, J. B., Thomas, S. D., Trent, J. O. & Miller, D. M. Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding. *J Biol Chem* **274**, 26369-26377 (1999).
- 195 Dapic, V. *et al.* Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res* **31**, 2097-2107 (2003).
- 196 Anwar, A., Ali, N., Tanveer, R. & Siddiqui, A. Demonstration of functional requirement of polypyrimidine tract-binding protein by SELEX RNA during hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation initiation. *J Biol Chem* **275**, 34231-34235, doi:10.1074/jbc.M006343200 (2000).
- 197 Miyakawa, S. *et al.* RNA aptamers to mammalian initiation factor 4G inhibit cap-dependent translation by blocking the formation of initiation factor complexes. *Rna* **12**, 1825-1834, doi:10.1261/rna.2169406 (2006).
- 198 Balinsky, C. A. *et al.* Nucleolin interacts with the dengue virus capsid protein and plays a role in formation of infectious virus particles. *J Virol* **87**, 13094-13106, doi:10.1128/JVI.00704-13 (2013).
- 199 Miki, Y., Tachibana, Y., Ohminato, Y. & Fujiwara, Y. Nucleolin Acts as a Scavenger Receptor for Acetylated Low-Density Lipoprotein on Macrophages. *Biol Pharm Bull* **38**, 1420-1424, doi:10.1248/bpb.b15-00260 (2015).
- 200 Cancio-Lonches, C. *et al.* Nucleolin interacts with the Feline calicivirus 3' untranslated region and the protease-polymerase NS6/7 protein, playing a role in virus replication. *Journal of virology*, doi:10.1128/JVI.01878-10 (2011).
- 201 Escobar-Herrera, J., Medina-Ramirez, F. J. & Gutierrez-Escolano, A. L. A carboxymethyl-cellulose plaque assay for feline calicivirus. *J Virol Methods* **146**, 393-396, doi:10.1016/j.jviromet.2007.07.013 (2007).
- 202 Hirano, K. *et al.* A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells. *J Biol Chem* **280**, 39284-39293, doi:10.1074/jbc.M505275200 (2005).
- 203 Cancio-Lonches, C. *et al.* Nucleolin interacts with the feline calicivirus 3' untranslated region and the protease-polymerase NS6 and NS7 proteins, playing a role in virus replication. *J Virol* **85**, 8056-8068, doi:10.1128/JVI.01878-10 (2011).
- 204 Izumi, R. E., Valdez, B., Banerjee, R., Srivastava, M. & Dasgupta, A. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* **76**, 17-29 (2001).
- 205 Srivastava, M., Fleming, P. J., Pollard, H. B. & Burns, A. L. Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS Lett* **250**, 99-105 (1989).

- 206 Valdez, B. C., Henning, D., Busch, R. K., Srivastava, M. & Busch, H. Immunodominant RNA recognition motifs of human nucleolin/C23. *Mol Immunol* **32**, 1207-1213 (1995).
- 207 Jiang, Y., Li, Z. & Nagy, P. D. Nucleolin/Nsr1p binds to the 3' noncoding region of the tombusvirus RNA and inhibits replication. *Virology* **396**, 10-20, doi:10.1016/j.virol.2009.10.007 (2010).
- 208 Waggoner, S. & Sarnow, P. Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocation of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J Virol* **72**, 6699-6709 (1998).
- 209 Mongelard, F. & Bouvet, P. AS-1411, a guanosine-rich oligonucleotide aptamer targeting nucleolin for the potential treatment of cancer, including acute myeloid leukemia. *Curr Opin Mol Ther* **12**, 107-114 (2010).
- 210 Reyes-Reyes, E. M., Teng, Y. & Bates, P. J. A new paradigm for aptamer therapeutic AS1411 action: uptake by macropinocytosis and its stimulation by a nucleolin-dependent mechanism. *Cancer Res* **70**, 8617-8629, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0920 (2010).
- 211 Dahl, B. H., Nielsen, J. & Dahl, O. Mechanistic studies on the phosphoramidite coupling reaction in oligonucleotide synthesis. I. Evidence for nucleophilic catalysis by tetrazole and rate variations with the phosphorus substituents. *Nucleic Acids Res* **15**, 1729-1743 (1987).
- 212 Lin, J. Y. *et al.* Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J Biomed Sci* **16**, 103, doi:10.1186/1423-0127-16-103 (2009).
- 213 Nisole, S. *et al.* The anti-HIV pseudopeptide HB-19 forms a complex with the cell-surface-expressed nucleolin independent of heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **274**, 27875-27884 (1999).
- 214 Tayyari, F. *et al.* Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat Med* **17**, 1132-1135, doi:10.1038/nm.2444 (2011).
- 215 Chen, J., Guo, K. & Kastan, M. B. Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA. *J Biol Chem* **287**, 16467-16476, doi:10.1074/jbc.M112.349274 (2012).
- 216 Woo, H. H., Baker, T., Laszlo, C. & Chambers, S. K. Nucleolin mediates microRNA-directed CSF-1 mRNA deadenylation but increases translation of CSF-1 mRNA. *Mol Cell Proteomics* **12**, 1661-1677, doi:10.1074/mcp.M112.025288 (2013).
- 217 Sicard, H. *et al.* The role of the *Schizosaccharomyces pombe* gar2 protein in nucleolar structure and function depends on the concerted action of its highly charged N terminus and its RNA-binding domains. *Mol Biol Cell* **9**, 2011-2023 (1998).
- 218 Chen, J., Guo, K. & Kastan, M. B. Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA. *J Biol Chem* **287**, 16467-16476, doi:10.1074/jbc.M112.349274 (2012).
- 219 Herold, J. & Andino, R. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* **7**, 581-591 (2001).
- 220 Alvarez, D. E., Lodeiro, M. F., Luduena, S. J., Pietrasanta, L. I. & Gamarnik, A. V. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol* **79**, 6631-6643, doi:10.1128/JVI.79.11.6631-6643.2005 (2005).

- 221 Nicholson, B. L. & White, K. A. Functional long-range RNA-RNA interactions in positive-strand RNA viruses. *Nat Rev Microbiol* **12**, 493-504, doi:10.1038/nrmicro3288 (2014).