

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“EFECTO DE LA INFECCIÓN POR EL CALICIVIRUS FELINO EN LA
INTEGRIDAD DE LAS NUCLEOPORINAS”**

Tesis que presenta

M. en C. José Eduardo Mora Heredia

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En

Infectómica y Patogénesis Molecular

Directora de la Tesis

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

El desarrollo del trabajo fue posible gracias al apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), siendo el autor del trabajo el becario número 377253 del programa.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio No.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 (CINVESTAV-IPN).

Director de Tesis

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano¹

Asesores de Tesis

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres¹

Dr. Juan Ernesto Ludert Leon¹

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda²

Dr. Martha Yocupicio Monroy³

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*Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas. Universidad Autónoma de la Ciudad de México*

ÍNDICE

Abstract	7
Resumen	8
Introducción	9
Antecedentes generales	10
<i>Gastroenteritis</i>	10
<i>Gastroenteritis virales</i>	10
<i>Calicivirus</i>	11
<i>Transmisión y epidemiología</i>	13
<i>Biología de los calicivirus</i>	14
<i>Proteínas virales</i>	16
<i>Proteínas no estructurales</i>	16
<i>Proteínas estructurales</i>	19
<i>Ciclo replicativo de los calicivirus</i>	21
Antecedentes directos	25
<i>Virus - Proteínas celulares</i>	25
<i>Transporte núcleo-citoplasma</i>	26
<i>Señales de localización y exporte nuclear (NLS y NES)</i>	27
<i>Complejo del poro nuclear (NPC)</i>	29
<i>Alteraciones en el transporte núcleo-citoplásmico</i>	32
<i>Alteraciones del transporte nucleo citoplásmico durante la infección con picornaviurs</i>	35

<i>Proteínas nucleares que interaccionan con los genomas de los Calicivirus</i>	37
Justificación	39
Hipótesis	39
Objetivos	40
<i>Objetivo general</i>	40
<i>Objetivos específicos</i>	40
Materiales y metodos	41
<i>Células y virus</i>	41
<i>Efecto citopático y ensayo de plaqueo</i>	41
<i>Anticuerpos</i>	41
<i>Western blot</i>	42
<i>Inmunofluorescencia - Microscopia confocal</i>	42
<i>Ensayos de inhibición</i>	43
<i>PCR - Amplificación y clonación de la proteína LC</i>	44
<i>Inducción de la proteína LC y producción del anticuerpo anti-LC</i>	45
<i>Trasfección de las proteínas virales LC y NS6/7</i>	46
Resultados	47
<i>La infección con el FCV provoca el procesamiento de algunas nucleoporinas</i>	47
<i>Nup270 y Nup153 se procesan a diferentes tiempos en la infección con el FCV</i>	49
<i>PTB y hnRNP A1 se localizan en el citoplasma de células infectadas con el FCV</i>	52

<i>Las nucleoporinas son proteolíticamente procesadas durante la infección con el FCV</i>	53
<i>Nup270 es procesada inicialmente por la proteasa viral, pero su degradación total depende de la caspasa-3</i>	56
<i>El ZnCl₂ inhibe a la proteasa viral NS6/7</i>	61
<i>La inhibición de caspasas no evita la localización citoplásmica de PTB y hnRNP A1 durante la infección con el FCV</i>	64
<i>El efecto citopático y la salida de partículas virales, no se afecta por la inhibición de las caspasas</i>	66
<i>Clonación de la proteína viral LC del FCV</i>	70
<i>Obtención de la proteína recombinante LC en bacterias</i>	73
<i>La proteína LC provoca un efecto citopático similar a de la infección por el FCV</i>	74
<i>La proteasa NS6/7 del FCV corta a la Nup270</i>	79
Discusión	86
Conclusiones	93
Perspectivas	94
Referencias	95

ABSTRACT

During infection by some RNA viruses, the transport of proteins between the nucleus and cytoplasm is affected as a result of direct damage on nucleoporins. Consequently, cytoplasmic accumulation of nuclear proteins involved in viral replication occurs. Nucleoporin processing may result from the action of proteases as and / or viral proteases. When analyzing the integrity of the nucleoporins in cells infected with feline calicivirus (FCV), the processing of some of them was identified, particularly Nup270 or TPR is detected from 3 hpi and continues during the later times until its degradation total between 7 and 9 hpi. The initial processing of Nup270 coincides with the expression of the NS6/7 protease-polymerase from FCV, suggesting that it may be responsible for its partial cleavage, which also agrees with the presence of nuclear proteins PTB and hnRNP A1 in the cytoplasm. On the other hand, since there is caspase activation from 5 hpi to FCV, it is also possible that it is involved in the total degradation of Nup270. Treatment of infected cells with specific inhibitors of caspases did not affect the initial cleavage of Nup270 or the cytoplasmic localization of PTB and hnRNP A1, but prevented the total degradation of Nup270, which suggest that Nup270 is a NS6/7 and caspases target. Treatment of FCV-infected cells with zinc chloride a viral proteases inhibitor, resulting in complete inhibition of NS6/7 expression and Nup270 processing, confirming that the initial nucleoporin process is caused by the virus and is not a consequence of the activation in apoptosis. The viral protein LC is responsible for the activation of caspases, however, transient transfection of LC did not induce caspase-3 activation nor the processing of Nup270. On the other hand, transfection of NS6 or NS6/7 did induce the processing of Nup270, disassembly of FG-nucleoporins and cytoplasmic localization of PTB and hnRNP A1. These results in the ensemble suggest that during FCV infection, the nucleoporins, as Nup270, are processed by NS6/7 to facilitate the cytoplasmic localization of PTB and hnRNP A1 nuclear proteins involved in viral replication.

RESUMEN

Durante la infección por algunos virus de RNA, el transporte de proteínas entre el núcleo y citoplasma es afectado como resultado del daño sobre las nucleoporinas. En consecuencia, se produce la acumulación citoplasmática de proteínas nucleares implicadas en la replicación viral. El procesamiento de nucleoporinas puede resultar de la acción de proteasas tales como caspasas y/o proteasas virales. Al analizar la integridad de las nucleoporinas en las células infectadas con el calicivirus felino (FCV), se identificó el procesamiento de algunas de ellas, particularmente el de la Nup270 se detecta a partir de las 3 hpi y continúa hasta su degradación total entre las 7 y 9 hpi. El procesamiento inicial de Nup270 coincide con la expresión de la proteasa-polimerasa NS6/7 del FCV, lo que sugiere que ésta podría ser responsable de su corte parcial, el cual concuerda con la presencia de proteínas nucleares PTB y hnRNP A1 en el citoplasma. Por otro lado, dado que existe una activación de caspasas a partir de las 5 hpi con FCV, es posible que estas estén implicadas en la degradación total de Nup270. El tratamiento de las células infectadas con inhibidores de caspasas, no afectó el corte inicial de Nup270 o la localización citoplasmática de PTB y hnRNP A1, pero impidió la degradación total de Nup270, lo que nos sugiere que la Nup270 es un blanco de NS6/7 y de las caspasas. El tratamiento de las células infectadas por el FCV con ZnCl₂, un inhibidor de proteasas virales, inhibió la expresión de NS6/7 y el procesamiento de la Nup270, confirmando que el procesamiento inicial de nucleoporina es causado por el virus y no es consecuencia de la apoptosis. La proteína viral LC es responsable de la activación de caspasas, sin embargo, la transfección transitoria de LC no indujo la activación de caspasa-3 ni el procesamiento de la Nup270. Por otra parte, la transfección de NS6 o NS6/7 si indujo el procesamiento de la Nup270, el desensamble de las nucleoporinas FG y la localización en citoplasma de PTB y hnRNP A1. Estos resultados en conjunto nos sugieren que durante la infección por FCV, la Nup270, es procesada por la NS6/7 para facilitar la localización citoplasmática de las proteínas nucleares PTB y hnRNP A1 implicadas en la replicación viral.

INTRODUCCIÓN

La familia *Caliciviridae* se compone de cinco géneros (*Lagovirus*, *Becovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* y *Vesivirus*) y cuatro géneros adicionales propuestos (*Bavovirus*, *Nacovirus*, *Recovirus* y *Valovirus*) (8, 10). Los calicivirus son virus no envueltos que poseen como genoma a un RNA de cadena sencilla y polaridad positiva; infectan a humanos y a una gran cantidad de vertebrados causando una variedad de enfermedades. Particularmente, los norovirus y sapovirus conocidos como calicivirus humanos (HuCVs), representan un problema de salud pública muy importante en todo el mundo afectando tanto a niños como adultos. Dada la dificultad para propagar a estos agentes en cultivos celulares, su estudio se ha visto rezagado. Sin embargo, el calicivirus felino (FCV) y el norovirus murino (MNV), representan dos de los mejores modelos para estudiar los aspectos de la biología y las diferentes estrategias que emplean para establecer una infección exitosa.

Algunas estrategias que los calicivirus han desarrollado, son el procesamiento de proteínas celulares que interfieren con su proceso de infección, la localización en citoplasma de proteínas nucleares implicadas en la replicación viral, y la inducción de apoptosis para promover la salida de la progenie viral.

En el presente trabajo, se analizó la integridad de las nucleoporinas, proteínas encargadas del transporte núcleo-citoplasma, con la finalidad de establecer su posible papel en la localización anormal de proteínas nucleares durante la infección por el FCV. Los resultados encontrados muestran el procesamiento de algunas nucleoporinas como la Nup358, Nup270, Nup214 y Nup153 durante la infección. Se observó que el procesamiento temprano de la Nup270, coincidió con la localización en citoplasma de PTB y hnRNP A1; también se identificó que el procesamiento de Nup270 ocurre por acción de la proteasa viral NS6/7, y por las caspasas activadas durante la apoptosis. Estos resultados nos sugieren que los calicivirus utilizan esta estrategia para tener acceso a las proteínas nucleares implicadas en su ciclo replicativo.

ANTECEDENTES GENERALES

Gastroenteritis

La gastroenteritis es una causa común de morbilidad y mortalidad entre personas de todas las edades en cualquier parte del mundo. Esta enfermedad consiste en una inflamación del estómago y de los intestinos causada por algunos virus, bacterias o parásitos. Los síntomas de la gastroenteritis incluyen diarrea, dolor abdominal, vómitos, dolor de cabeza, fiebre y escalofríos, pero la mayoría de las personas se recupera sin tratamiento. El problema más común con la gastroenteritis es la deshidratación, la cual se presenta si no se ingieren suficientes líquidos para sustituir los que se pierden con los vómitos y la diarrea. La etapa de deshidratación es más común en bebés, niños pequeños, ancianos y personas con un sistema inmunitario débil (1). Las deshidrataciones como consecuencia de enfermedades diarreicas, son las enfermedades más comunes producidas por la ingesta de alimentos contaminados con algún patógeno. La OMS estima que las diarreas son responsables de la mitad de la carga mundial de enfermedades transmitidas por alimentos, causada por 31 posibles riesgos dentro de los que se encuentran los norovirus. Se calcula que de 550 000 personas que enferman de diarrea cada año, 230 000 mueren, estimándose 220 000 niños menores de 5 años, de los cuales 96 000 mueren al año (2).

Gastroenteritis virales

También conocidas como gripe de estómago, las cuales pueden afectar a cualquier persona en todo el mundo. Esta enfermedad altamente contagiosa se propaga a través del contacto cercano con personas que están infectadas, o a través de alimentos o agua contaminados. Se puede propagar fácilmente en espacios cerrados, tales como guarderías, escuelas, hogares de ancianos, y cruceros. La principal complicación de la gastroenteritis viral es la deshidratación causada por la diarrea, que puede ser muy grave en bebés y niños pequeños (1, 2). Según el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), la gastroenteritis viral es la principal causa de diarrea grave en adultos y niños (NCBI, 2012). Los niños menores de cinco años y los ancianos son particularmente vulnerables a la diarrea severa. Diferentes virus

pueden causar la enfermedad, cada uno con su propia temporada alta, siendo los más comunes rotavirus y norovirus, estos últimos clasificados en la familia *Caliciviridae*. Los calicivirus humanos, principalmente del género *Norovirus* son responsables en gran parte de los casos esporádicos y de la mayoría de brotes virales de gastroenteritis que ocurren en el mundo. La OMS recientemente emitió un informe exhaustivo que estima que en la carga global de las enfermedades transmitidas por alimentos, los norovirus se ubican como la causa número 1, y el número 4 de las muertes de origen alimenticio (1, 2).

Calicivirus

La familia *Caliciviridae* está conformada por virus pequeños (27-40 nm de diámetro) que no poseen envoltura viral y su genoma está constituido por una molécula de RNA (RNA monocatenario), poliadenilado, de polaridad positiva, de 7-8 kb, que infectan a una gran variedad de mamíferos incluyendo al humano (4). Esta familia de virus está formada por 5 géneros bien establecidos: *Vesivirus*, *Nebovirus*, *Lagovirus*, *Sapovirus* y *Norovirus* (5) y cinco géneros propuestos aun no clasificados (Atlantic salmon calicivirus, Bavovirus, Nacovirus, Recovirus, y Valovirus) (Fig. 1). Además un nuevo calicivirus, “Secalivirus” que recientemente ha sido parcialmente secuenciado (6, 7, 8, 9, 10, 11, <http://www.caliciviridae.com/>).

Los calicivirus son conocidos por infectar a una gran variedad de hospederos. En animales, el sapovirus porcino y el norovirus bovino causan brotes epidémicos de gastroenteritis en lechones y terneros, respectivamente (12), otros como la enfermedad fatal del hígado en conejos causada por el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) del género *Lagovirus* (13), enfermedad del tracto respiratorio superior en gatos causada por el Calicivirus felino (FCV) del género *Vesivirus* (14), y la diarrea asociada con el Calicivirus porcino entérico (PEC), un miembro del género *Sapovirus*, entre otros (15). Las cepas de Norovirus que infectan a humanos (NoVHu) del genogrupo GII genotipo 4 (GII.4), son responsables de la mayoría de los brotes, incluyendo pandémicos. Mientras que los síntomas son agudos y se resuelven a los pocos días sin tratamiento, la infección por los NoVHu puede resultar en una enfermedad inflamatoria intestinal o enterocolitis neonatal (16, 17,

18). Además se ha reportado que causan infecciones persistentes en poblaciones jóvenes y ancianas (19, 20).

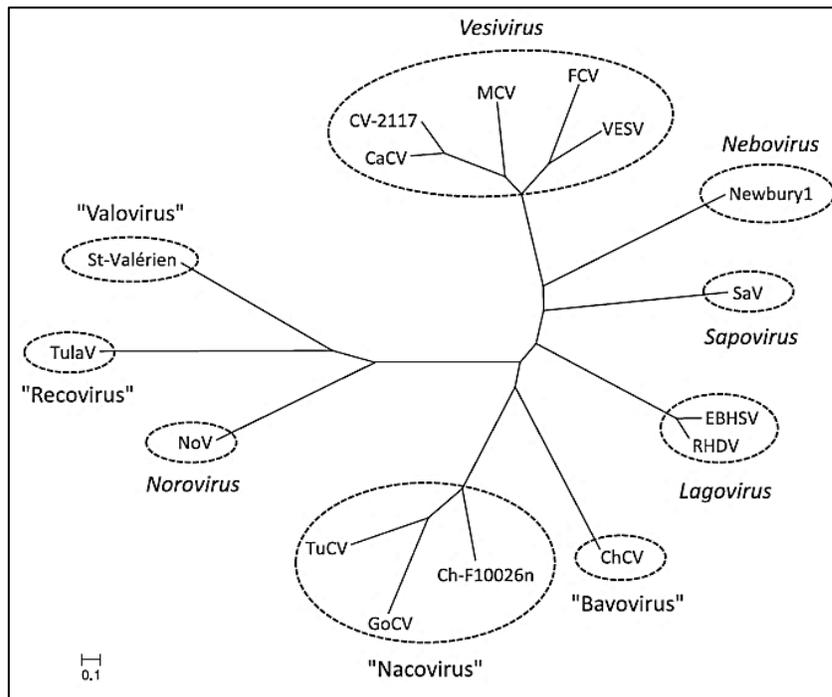


Figura 1. Relación filogenética entre el GoCV (calicivirus del ganso) y otros calicivirus. El análisis se basó en la longitud total de la secuencia de aminoácidos de la proteína VP1 (11).

Los NoVHu, son el principal agente etiológico de gastroenteritis epidémica no bacteriana (21, 22). El prototipo de los norovirus, el virus Norwalk, identificado en 1972, fue el primer virus descrito como causa de gastroenteritis en humanos (Fig. 2), pero la epidemiología y la importancia de este patógeno en la salud humana se desconocía, debido a la falta de métodos de cultivo y de diagnóstico eficientes. Durante el inicio de la década de los 90s otros virus semejantes fueron identificados en especímenes fecales por microscopía electrónica, y por su forma y similitud al agente Norwalk se clasificaron como Norwalk like viruses y posteriormente fueron clasificados como norovirus (23).

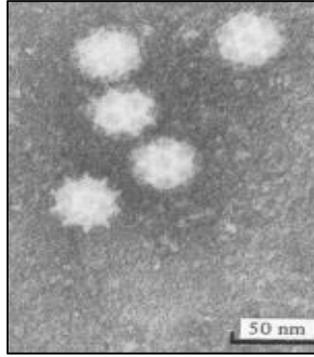


Figura 2. Microscopía electrónica de partículas de virus Calicivirus-like en muestras fecales de humano (24).

Transmisión y Epidemiología

Los norovirus y sapovirus son virus genéticamente y antigénicamente diversos y comúnmente son referidos como calicivirus humanos (HuCVs) (25). Particularmente, los NoVHu pueden causar infección del tracto gastrointestinal, son altamente infecciosos y muy pocas partículas virales son necesarias para causar la infección. El curso de la infección por norovirus es rápido, con un periodo de incubación de 24-48 hrs. Los síntomas comienzan después de 24 hrs de haber ingerido al virus y generalmente la enfermedad se manifiesta con vómito y diarrea con o sin náuseas y dolor abdominal; típicamente la infección por norovirus causa gastroenteritis aguda que se resuelve con los días (26). El NoVHu se puede diseminar por comer o beber agua que ha sido contaminada por pequeñas cantidades de vómito o heces de gente infectada, también puede propagarse por contacto directo con la persona o a través de superficies. Mariscos crudos o poco cocidos, como las ostras también han sido una fuente de infección (3).

En todo el mundo, aproximadamente uno de cada cinco casos de gastroenteritis aguda (diarrea y vómitos) es causado por norovirus. Globalmente, se estima que el norovirus es la causa más común de gastroenteritis aguda, siendo el responsable de 685 millones de casos cada año, 200 millones de estos casos se encuentran entre los niños menores de 5 años de edad. Esto lleva a una estimación de 50 000 muertes infantiles cada año, la mayoría de los cuales ocurren en los países en desarrollo. Aunque la mayoría de las muertes ocurren en los países desarrollados, el norovirus es un problema tanto en los países con bajos como altos estándares de

higiene. Cada año se estima que el norovirus causan pérdidas de hasta 60 mil millones de dólares, principalmente a los costos de la atención médica (dinero gastado para tratar las complicaciones de norovirus) y a la pérdida de productividad. La cepa de NoVHu más común (GII4) es una de las principales causas de brotes en todo el mundo, sin embargo, nuevas cepas de norovirus emergen aproximadamente cada 2 a 4 años. A menudo, pero no siempre, estas nuevas cepas llevan a un aumento de brotes en todo el mundo (2, 3).

Actualmente la División de Enfermedades Virales de los CDC trabaja para identificar la carga de gastroenteritis aguda causada por norovirus y prevenir brotes de estos virus en todo el mundo (2, 3).

A pesar de su importancia como generadores de enfermedad y de la pérdida económica como consecuencia de los elevados costos hospitalarios y la falta de días laborables generada, los norovirus no han podido ser propagados convenientemente en cultivos celulares, por lo que se han utilizado modelos animales para el estudio de su biología. Tal es el caso del FCV, que puede propagarse en cultivos celulares y para el cual existen sistemas de genética reversa, lo cual ha permitido generar mucha de la información sobre la biología molecular de esta familia de virus.

Biología de los Calicivirus

Los calicivirus poseen un genoma de RNA lineal de cadena sencilla de 7.4-7.7 kb (7642 nucleótidos) el cual está típicamente organizado en tres marcos de lectura abiertos (ORFs 1-3). El genoma de los calicivirus carece de la estructura Cap en su extremo 5' que es característica de los RNA mensajeros eucarióticos; en su lugar, tiene unida covalentemente a una proteína viral llamada VPg que ha sido considerada como un cap proteináceo debido a que es capaz de reclutar a factores del inicio de la traducción y promover la síntesis de proteínas tanto del RNA genómico como del subgenómico. En seguida a esta, se encuentra la región no traducida (RNT) 5' corta compuesta de los primeros 5 y hasta los 21 nucleótidos según el genoma de cada miembro de la familia, seguida de los tres ORF's. La región 5' proximal del genoma de norovirus codifica a todas las proteínas no estructurales en un solo ORF (ORF 1),

mientras que la región 3' proximal se transcribe en un mensajero sub-genómico que codifica a las proteínas estructurales mayoritaria y minoritaria de la cápside a partir de dos ORFs separados (ORF2 y ORF3 respectivamente), seguidos de una RNT 3' de entre 66-80 nucleótidos y una cola de poli A.

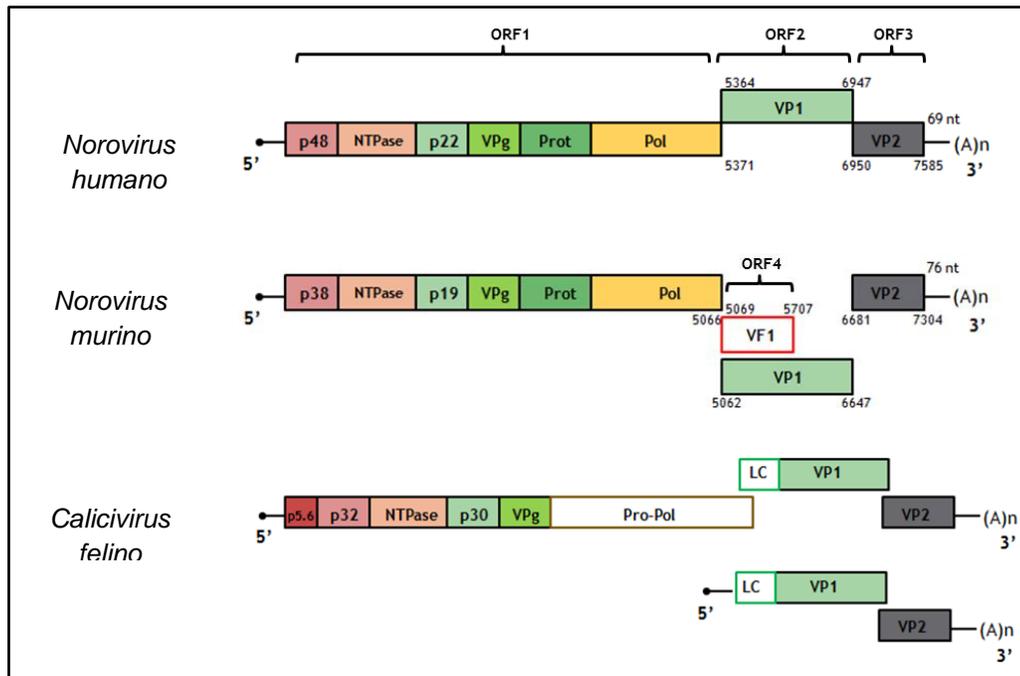


Figura 3. Organización genómica de tres miembros de la familia *Caliciviridae*. Representación esquemática que muestra el arreglo del genoma y subgenoma viral, mostrándose las proteínas para las que codifica cada RNA (27, 28)

En el caso del MNV, que al igual que el NoVHu se clasifica dentro del género *Norovirus*, se ha identificado la presencia de un ORF4 que codifica para una proteína llamada factor de virulencia 1 (VF1), la cual se ha propuesto que participa en la regulación de la respuesta inmune innata (29). Así mismo, en el FCV el ORF2 produce a una proteína inmadura que es procesada en dos péptidos: la proteína mayoritaria de la cápside VP1 y la proteína líder de la cápside (LC), la cual se encontró asociada al efecto citopático (CPE) (30) (Fig. 3).

Análisis bioinformáticos recientes de los genomas de calicivirus han identificado estructuras secundarias conservadas que incluyen: dos o más estructuras de tallo y burbuja en el extremo 5'; una estructura de horquilla en el extremo 3'; una

estructura de tallo y burbuja río arriba de la unión ORF1/2 en la cadena anti-genómica propuesto como un componente del promotor sub-genómico; y una estructura de tallo y burbuja en el extremo 5' de la región codificante de la polimerasa. Todas estas estructuras han sido determinadas como críticas para la replicación del MNV (31).

Proteínas virales

Los Calicivirus producen una poliproteína a partir del ORF1 que es procesada por la proteasa viral para generar las proteínas no estructurales maduras y un número de proteínas precursoras. Para el FCV el procesamiento co-traducciona l de la poliproteína produce 6 proteínas no estructurales: p5.6 (NS1), p32 (NS2), p39 (NS3), p30 (NS4), p13 (NS5) y p76 (NS6/7), además de proteínas precursoras (32). Para el MNV, el procesamiento de la poliproteína también produce 6 proteínas no estructurales pero con dos principales diferencias: p5.6 y p32 están fusionadas en NS1/2, mientras que NS6/7 se procesan en NS6 (proteasa viral) y NS7 (RNA polimerasa viral dependiente de RNA) (33). Las proteínas estructurales VP1 y VP2, son generadas a partir de un RNA sub-genómico de aproximadamente 2.3 kb, conformado por los ORF2 y 3 (34)

Proteínas no estructurales

NS1 y *NS2*. Los primeros péptidos no estructurales codificados en el ORF1 del FCV son p5.6 y p32. La proteína de 23 kDa se cree es análogo de p32 de FCV y con similitud funcional con la proteína 2B de los picornavirus. La proteína p32 del FCV se ha encontrado en complejos de replicación membranosos (35), mientras que el análogo p48 de NV el cual posee un dominio hidrofóbico cerca del C-terminal llamado dominio trans-membrana (TM), interactúa con el regulador SNARE de las vesículas asociadas a proteínas de membrana asociadas a la proteína A (VAP-A) jugando un papel importante en la fusión de vesículas mediadas por SNARE (36, 37). El hecho de que la replicación de los virus de RNA ocurra sobre membranas intracelulares, hace probable que 2B se coordine con las propiedades de localización de VAP-A para anclar los complejos de replicación a membranas (37).

NS3 o NTPasa. La proteína p39 de la superfamilia 3 de las RNA helicasas, es capaz de unirse al ATP *in vitro* (38). Esta proteína posee un dominio de unión a NTP similar a la 2C-NTPasa de los picornavirus. Se ha observado que la proteína 2C-like en el RHDV hidroliza nucleósidos trifosfato *in vitro*. En el FCV la colocalización de p39 con los complejos de replicación viral es también indicativa de un posible papel en la replicación (39). Recientemente se identificó que p39 del FCV suprime la respuesta inmune innata del hospedero, evitando la activación de IRF-3 (40).

NS4. La proteína p30 del FCV posee una hélice anfipática, la cual tiene propiedades de asociación a membranas (39). Esta proteína ocupa una posición en el genoma de los calicivirus similar a la posición de la proteína 3A en genomas de picornavirus. La proteína 3A de poliovirus es importante para la localización en membrana de los complejos replicativos (41, 42). De acuerdo a las propiedades asociadas a replicación de 3A, la p30 de FCV se localiza en complejos de membrana con la polimerasa competente en aislados de células infectadas con FCV (35).

NS5 o VPg. La proteína p13 del FCV es una proteína de ~15 kDa que se encuentra unida covalentemente a los RNA mensajeros genómicos y sub-genómicos en sus extremos 5' (43). VPg desempeña varias funciones en los ciclos replicativos virales (43, 44, 45). En el caso de los calicivirus, la VPg recluta a la maquinaria de traducción mediante la interacción con el factor de inicio de la traducción eIF4E para el FCV, y eIF4G para el MNV, además de su interacción con la subunidad ribosomal 40S. Asimismo, se ha determinado que la separación de VPg del genoma viral causa una inhibición de la síntesis de proteínas. Ambas evidencias sugieren fuertemente la participación de VPg en la traducción de esta familia de virus (46, 47, 48, 49). De igual forma, en algunas familias de virus que incluyen a la *Picornaviridae*, *Potyviridae* y a la misma *Caliciviridae*, VPg actúa como primer para la replicación del genoma viral (152).

NS6. La proteína 3C o NS6, es la única proteasa de los calicivirus. La NS6 posee una diada catalítica funcional compuesta de His30 y Cys139, similar a la 3CL^{pro} del virus de la hepatitis A. Esta proteasa se ha clasificado como una serin proteasa relacionada con la proteasa 3C de los picornavirus (50). En la mayoría de los

miembros de la familia *Caliciviridae*, esta puede encontrarse como un precursor asociado con VPg, o con la polimerasa viral (NS7), aunque la forma más comúnmente encontrada en células infectadas es como un péptido independiente. Sin embargo, en el caso del FCV la proteína proteasa-polimerasa no es procesada y el bipéptido mantiene las dos funciones de proteasa y de polimerasa (NS6/7) (50, 51, 52). La proteasa viral de los calicivirus es la responsable del procesamiento de la poliproteína producida del ORF1, para dar lugar a las diferentes proteínas virales; para el caso del FCV, la proteasa viral también es responsable del procesamiento de la proteína precursora generada por el ORF2, para así dar lugar a las proteínas VP1 y LC (30). NS6 es uno de los componentes virales principales para el establecimiento de la infección, entre las diferentes moléculas blanco que podría tener la proteasa de los calicivirus durante la infección, se identificó recientemente a G3BP1, una proteína citoplasmática importante para la formación de los gránulos de estrés citoplásmicos (SGs). El ensamblaje de los SGs se promueve como parte de la respuesta hacia el estrés celular, por lo que, se sugiere que el corte de la proteína G3BP1 por la proteasa del FCV, es una estrategia que el virus utiliza para manipular las vías de respuesta a estrés y posiblemente la respuesta antiviral innata. Sin embargo, el corte de la proteína G3BP1 no ocurre durante la infección por el MNV, lo cual indica que los calicivirus tienen distintos efectos sobre las vías de respuesta a estrés (53).

NS7 ó replicasa viral (RdRp). La NS7 es la RNA polimerasa dependiente del RNA viral (RdRp), esta proteína se encarga de la síntesis de los RNAs genómico y subgenómico viral (54). Son pocos los estudios de cristalografía de las proteínas de los virus de esta familia, sin embargo, se ha reportado que la RdRp de los norovirus presenta elementos estructurales y catalíticos característicos de las RdRp de otros virus de RNA de polaridad positiva como los dominios de dedos, palma y pulgar comunes para todas las polimerasas (55).

VF1. Proteína conocida como factor de virulencia 1, identificada en el genoma del MNV. La identificación de VF1 representa la primera caracterización de una proteína de marco de lectura abierto alternativa para la familia de los calicivirus. Este ORF4 se identificó sobrelapado con el ORF2, pero con un codón de inicio distinto.

Su función reguladora de la respuesta inmune y de la apoptosis en las células infectadas, ha proporcionado perspectivas importantes para futuras investigaciones sobre la biología y la patogénesis de los norovirus (29).

LC. Recientes ensayos con el FCV, identificaron que el precursor de la cápside codificado por el ORF2 es post-traduccionalmente procesado por la propia proteasa viral para producir dos proteínas maduras: la proteína mayoritaria de la cápside VP1, y una proteína pequeña (124 aminoácidos) llamada proteína líder de la cápside (LC), la cual se ha asociado con el efecto citopático (CPE), y a la activación de caspasas (30)

Proteínas estructurales

Los viriones de norovirus están compuestos de 90 dímeros de la proteína mayoritaria de la cápside VP1, y por una o dos copias de la proteína minoritaria estructural VP2. Ambas proteínas son sintetizadas a partir de un RNA subgenómico que contiene tanto el ORF2 como el ORF3 (56).

VP1. Comprende un rango de ~530-555 aminoácidos con un peso molecular calculado de 50-60 kDa. Dos dominios conservados flanquean un dominio variable central en el cual se localizan los determinantes antigénicos que definen la especificidad de la cepa. Las partículas tipo virus pueden ser expresadas y purificadas con una alta fidelidad relativa, y son la fuente de muchos datos recaudados sobre los dominios funcionales y estructurales de VP1 y de las cápsides de los norovirus. Las partículas tipo virus se ensamblan en ausencia de VP2, aunque algunas evidencias sugieren que VP2 juega un papel importante en la estabilidad de la partícula (57, 58). VP1 comprende dos dominios principales denominados S por dominio “shell” y P por dominio “protruding” (59) (Fig. 4).

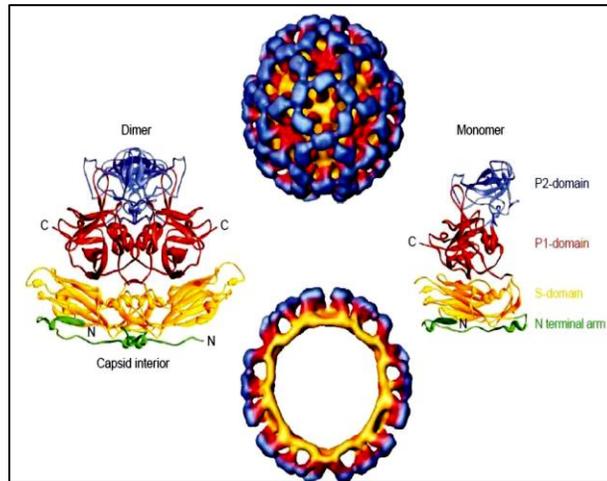


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de la partícula viral y la proteína estructural de la cápside VP1 (61).

Aproximadamente 225 aminoácidos del N-terminal constituyen el dominio S que contiene elementos esenciales para la formación del icosaédro. El dominio P comprende el resto de los aminoácidos y se divide en dos subdominios, P1 y P2. Los dominios P interactúan en contactos diméricos que incrementan la estabilidad de la cápside y de las protrusiones sobre el virión. El dominio P2 es una inserción de 127 aminoácidos, y dentro de éste se localiza la región hipervariable que juega un papel importante en la unión al receptor y reactividad inmune, y es el principal responsable para las interacciones con antígenos del grupo ABO asociados con susceptibilidad a la infección por norovirus (60). Además, se sabe que la proteína VP1 incrementa la actividad de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) del norovirus humano GII.4 y del MNV, teniendo un papel regulador en el ciclo replicativo de los norovirus, por el incremento en la replicación del RNA viral, y su disminución cuando VP1 esta ausente (153).

VP2. Compuesta de 208-268 aminoácidos con un peso molecular calculado de 22-29 kDa, exhibe extensas secuencias variables entre las diferentes cepas (62). El papel de la VP2 en el ciclo replicativo aún no se conoce, pero es claro que es una proteína minoritaria estructural presente en una o dos copias por virion, descrita en norovirus y otros calicivirus (32, 63). VP2 no es necesaria para el ensamblaje de las partículas tipo virus, pero es esencial para la producción de virus infecciosos, como se determinó para el caso del FCV mediante un sistema de genética reversa (64).

Ciclo replicativo de los calicivirus

El ciclo replicativo de los calicivirus se puede dividir en siete etapas claramente identificadas en las cuales se encuentran involucradas diferentes moléculas de la célula huésped: 1) unión al receptor, 2) entrada (mediada por endocitosis o por dinamina y colesterol), 3) liberación del genoma viral, 4) traducción, 5) replicación del genoma viral, 6) ensamblaje y 7) Salida de partículas virales (Fig. 5).

Unión a receptor. Los norovirus humanos reconocen antígenos de los grupos sanguíneos (del inglés histo blood group antigens o HBGAs) que se expresan sobre la superficie de células epiteliales de la mucosa. Estos HBGAs son carbohidratos neutros unidos a proteínas o lípidos sobre la superficie celular. La asociación de los norovirus con HBGAs ha demostrado ser fundamental para ciertas cepas de virus. Estudios *in vivo* también demostraron que estos antígenos son esenciales para la susceptibilidad del humano hacia la infección por norovirus (65, 66). Algunos calicivirus animales también se unen a HBGAs incluyendo virus del género *Lagovirus* y *Recovirus*; mientras que algunas cepas del MNV y del FCV además se unen al ácido siálico de células permisivas (26). En el caso particular, del FCV, se identificó una molécula de la superficie celular como receptor de unión conocida como molécula de uniones adherentes 1(JAM-1), un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresada por varias células, y que está involucrada en la regulación de interacciones célula-célula en el sistema inmune y en la formación de uniones estrechas de la zona apical (67). En el virus Norwalk, existen otros estudios que han puesto de manifiesto la interacción de VP1 con una proteína de la superficie celular de 105 kDa la cual no ha sido identificada (68).

Entrada. Para tener acceso a la célula huésped, los virus deben reconocer a su receptor en la superficie celular y posteriormente utilizar algunos componentes celulares para internalizarse. El FCV entra a las células por endocitosis mediada por clatrina de una forma dependiente del pH (73, 74). Recientemente, se ha descrito que la entrada del MNV es independiente del pH, de clatrina y caveolina, pero dependiente de dinamina II y de colesterol (75, 76, 77). Sin embargo, hay reportes de

que los virus como carga endosomal, pueden utilizar diferentes vías encocíticas que se sobrelapan con la vía de endosomas tempranos o tardíos (78, 79). En los compartimentos endosomales se encuentran enzimas del huésped que incluyen catepsinas, proteínas involucradas en la fusión de algunos virus y/o desnudamiento de la cápside (80). Un trabajo reciente, sugiere un papel crucial de la catepsina L en la replicación de los calicivirus, y como un posible blanco terapéutico para la infección por los calicivirus (81)

Liberación del genoma viral. Como parte de la entrada, los virus deben liberar su genoma viral en el citoplasma de la célula huésped para llevar a cabo su ciclo replicativo. Este evento crítico durante el ciclo de vida del virus, es generalmente disparado por el ambiente ácido de los endosomas y/o por la unión a receptores celulares (82).

Traducción y replicación del genoma viral. Los virus de RNA de polaridad positiva como es el caso de los virus de la familia *Caliciviridae*, cuyo genoma tiene la misma polaridad que la de los RNAm, tienen la capacidad de sintetizar sus proteínas utilizando la maquinaria de traducción de la célula huésped, para posteriormente llevar a cabo su replicación y el resto de su ciclo en el citoplasma de la célula. En el caso del FCV, se conoce que existe una inhibición de la síntesis de proteínas celulares inducida por la infección, que representa una estrategia en la cual reduce la competencia con los RNAm endógenos para utilizar la maquinaria traduccional celular. La proteína VPg, unida covalentemente al genoma viral, es capaz de interactuar con varios factores del inicio de la traducción, y con ello promover una traducción exitosa. Así mismo se conoce que la separación de VPg del genoma viral trae como consecuencia una inhibición de la traducción viral, lo cual es otra evidencia de la participación de esta proteína en la traducción de los calicivirus. VPg, se encuentra unida tanto al RNA genómico como al subgenómico, por lo que participa en la síntesis de las proteínas no estructurales y estructurales (83). En cuanto a la replicación del RNA genómico y subgenómico, este proceso aún es poco conocido, sin embargo, se sabe que la polimerasa viral es la encargada de la síntesis de ambos

RNAs, y este proceso se lleva a cabo en complejos membranosos adosados al retículo endoplásmico en presencia de todas las proteínas no estructurales (83).

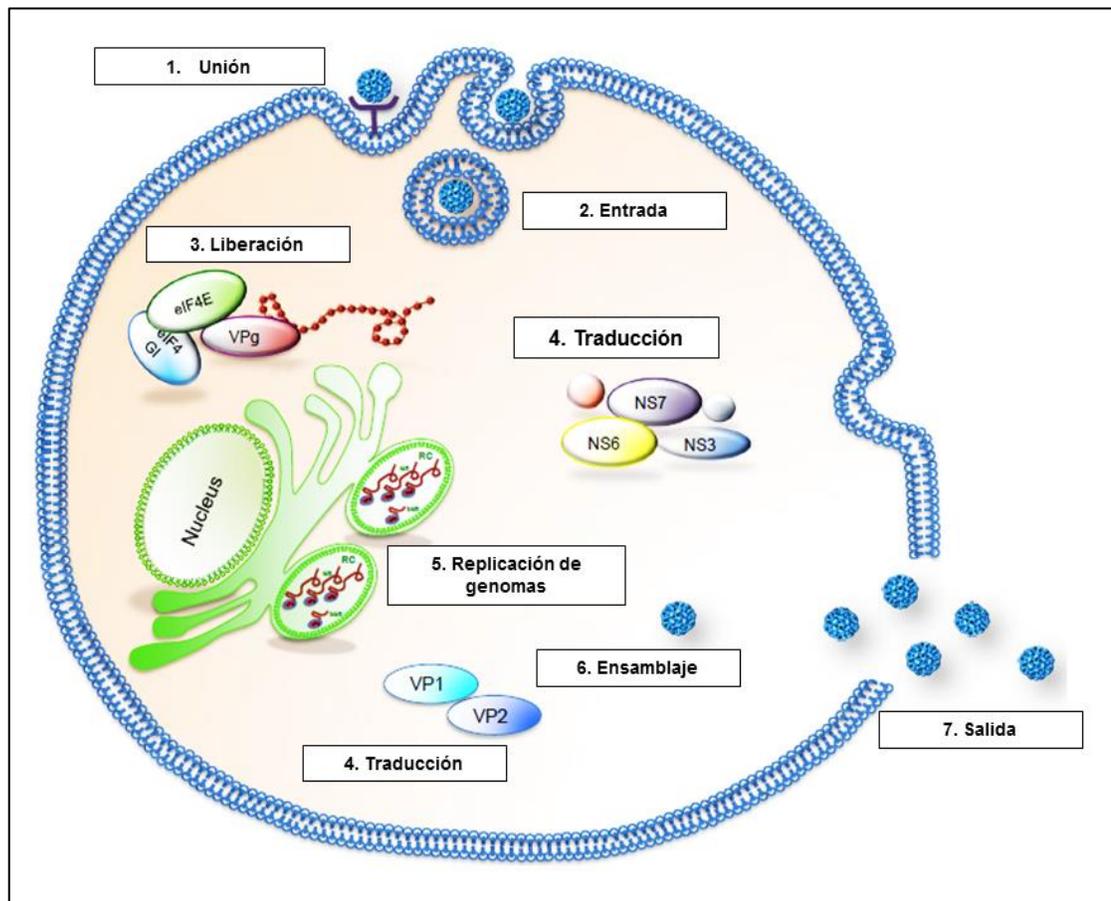


Figura 5. Representación esquemática del ciclo replicativo de los calicivirus.

En años recientes ha quedado ampliamente establecido que el ciclo replicativo de los virus requiere la interacción entre componentes virales y varios factores de la célula huésped (84, 85, 86). En particular, en los virus de RNA de polaridad positiva, la interacción de proteínas de unión a ácidos nucleicos de la célula huésped con elementos de la estructura del RNA usualmente presentes en los extremos 5' y 3' del genoma viral, están implicados en la traducción y replicación viral (86). Estas interacciones a menudo contribuyen a la especificidad de huésped, tropismo de tejidos y patología de las infecciones. Para los calicivirus, se ha reportado la interacción *in vitro* de varias proteínas de unión a ácidos nucleicos de la célula

huésped con los extremos 5' y 3' del RNA genómico del virus Norwalk (NV), del FCV y del MNV (87, 88, 89, 90).

Entre las proteínas identificadas se encuentran la proteína de unión a poly-C (PCBP), la proteína o autoantígeno La (La), la ribonucleoproteína heterogéneo nuclear L (hnRNP L), la proteína de unión a poly-A (PABP) y la proteína de unión al tracto de polipirimidinas (PTB), todas ellas capaces de unirse a la región no traducida 3' del NV. Más recientemente, se estableció que PTB se une a la RNT 5' del FCV, e inhibe la traducción para dar paso a la replicación del RNA del FCV (89). Igualmente se ha descrito que la proteína nucleolina interactúa con el genoma y la región 3' no traducida del FCV, y participa en los procesos de traducción (91, 92). Por otro lado, también se identificó la interacción de las proteínas nucleares PCBP2 y hnRNP A1 con el genoma del MNV, y su participación en la circularización del genoma viral para hacer la replicación más eficiente (90).

Ensamblaje y Salida. Finalmente, una vez que el virus ha sintetizado todas sus proteínas tanto estructurales como no estructurales, y que ha replicado su genoma viral, se lleva a cabo el ensamblaje de las nuevas partículas virales, las cuales eventualmente, saldrán de la célula huésped para infectar a nuevas células. Por estudios de cristalografía de las cápsides virales, se asume que la formación de la cápside es concomitante a la encapsidación del genoma viral, debido a que cuando esta se ensambla, no se forman poros por donde el genoma pueda ser internalizado, como en el caso de poliovirus.

ANTECEDENTES DIRECTOS

Virus - Proteínas celulares

La austeridad de los genomas virales y su número limitado de genes, hacen a los virus incapaces de replicarse y propagarse por sí solos. Debido a esto, los virus interactúan con muchas vías celulares para lograr su ciclo de vida. Desde su primer contacto con la célula hospedera, hasta la salida de la progenie viral que infectara a células vecinas, hay pasos que requieren interacciones específicas entre el virus y su huésped. Un ejemplo muy bien estudiado, es el hecho de que los virus utilizan la maquinaria traduccional para la síntesis de sus proteínas, además de que la célula proporciona estructuras y/o factores celulares para hacer este proceso y la replicación de sus genomas más eficientes. Además, la evasión de la respuesta inmune del huésped requiere una gran cantidad de proteínas virales para asociarse con e inhibir las proteínas celulares con funciones antivirales. Particularmente, en los virus de RNA de polaridad positiva, esta dependencia no se limita a las moléculas que se encuentran en el citoplasma, que es el lugar en donde llevan a cabo su replicación, sino que dependen también de moléculas que se encuentran compartimentalizadas en diversos organelos como es el núcleo. Distintas líneas de evidencia han demostrado que algunas proteínas virales, como las replicasas y las proteasas tienen acceso al núcleo de la célula huésped; así mismo, se ha descrito que proteínas celulares con una localización predominantemente nuclear son localizadas específicamente en citoplasma tras la infección, como una consecuencia de la alteración del transporte entre el núcleo y el citoplasma (97, 98, 99, 100, 101). Esta redistribución de proteínas inducida por algunos virus, puede o no ser debida a un mecanismo inespecífico, en el cual todas las proteínas que usan el transporte núcleo-citoplasma están siendo afectadas, o específico en donde solo algunas de ellas son afectadas, por ejemplo, cuando son blanco de un procesamiento de la secuencia de localización nuclear inducida por proteasas virales que transitan por el núcleo (93).

Transporte núcleo-citoplasma

Una característica clave de las células eucariotas es la compartimentalización de actividades; por ejemplo el recinto del genoma reside en el núcleo, en donde ocurre la replicación del DNA y la biogénesis del RNA, mientras que la síntesis de proteínas ocurre en el citoplasma. Ambas actividades se encuentran bien definidas en todos los organismos eucariotas y están estrechamente relacionadas, por lo que se requiere de un sistema de transporte selectivo y regulado de proteínas y RNA entre ambos compartimentos. Los organelos se separan del citoplasma por membranas y las moléculas pueden moverse entre estos compartimientos a través de poros especializados para el transporte. Particularmente, la envoltura nuclear está compuesta por una membrana interna y externa que impide que macromoléculas, incluidas algunas proteínas y RNAs, se muevan libremente en el núcleo desde el citoplasma y viceversa. Las membranas de la envoltura nuclear se unen intermitentemente por complejos de poros nucleares (NPCs), cuya función es el transporte especializado y selectivo de moléculas.

El complejo de poro nuclear (NPC), es un largo canal proteínico que atraviesa la membrana interna y externa que comprende la envoltura nuclear (NE). Estos poros nucleares controlan la entrada y salida de macromoléculas desde el núcleo y/o el citoplasma. En la literatura se han descrito claramente dos modelos de transporte a través de estos poros, el transporte pasivo, el cual permite la difusión de moléculas pequeñas incluyendo el agua, iones, metabolitos y algunas proteínas menores de 30 kDa a través el poro; y el tráfico de grandes moléculas que es altamente selectivo y depende de la interacción con receptores intermediarios solubles móviles, que los acompañan a través del poro como un complejo (107, 108, 109, 110, 111). Estos receptores reconocen generalmente péptidos señales sobre las moléculas cargo, conocidas como señal de localización nuclear (NLS) y secuencia de exporte nuclear (NES). En consecuencia, las NLSs gobiernan el importe nuclear vía la interacción con receptores de la familia de las importinas, y las NESs que permiten el exporte nuclear a través de la interacción con receptores relacionados a la exportina. Más de

20 receptores de dicho transporte núcleo-citoplásmico (NTRs), también conocidos como karyoperinas se han identificado hasta la fecha en seres humanos (112).

Tabla 1. Factores transportados por Karioperinas en levaduras y vertebrados (125).

<i>S. cerevisiae</i> Karyopherins	Vertebrate Karyopherins	Examples of Cargo(s): (v) –vertebrate, (sc) – <i>S. cerevisiae</i>
Kap95	Importin-β1	Imports via sc-Kap60/v-importin-α adaptor proteins with cNLS; Imports via v-Snurportin the UsnRNPs; with no adaptor, imports v-cargo SREBP-2, HIV Rev, HIV TAT, cyclin B
Kap104	Transportin or Transportin 2	Imports sc-cargo – Nab2, Hrp1; v-cargo – PY-NLS proteins, mRNA-binding proteins, histones, ribosomal proteins
Kap108/Sxm1	Importin 8	Imports sc-cargo – Lhp1, ribosomal proteins; v-cargo – SRP19, Smad
Kap109/Cse1	CAS	Imports sc-cargo – Kap60/Srp1; v-cargo – importin αs
Kap111/Mtr10	Transportin SR1 or SR2	Imports sc-cargo – Npl3, tRNAs; v-cargo – SR proteins, HuR
Kap114	Importin 9	Imports sc-cargo – TBP, histones, Nap1, Sua7; v-cargo – histones, ribosomal proteins
Kap119/Nmd5	Importin 7	Imports sc-cargo – Hog1, Crz1, Dst1, ribosomal proteins, histones; v-cargo – Smad, ERK, GR, ribosomal proteins
Kap120	HsRanBP11	Imports sc-cargo – Rpf1
Kap121/Pse1	Importin 5/Importin β3/RanBP5	Imports sc-cargo – Yra1, Spo12, Ste12, Yap1, Pho4, histones, ribosomal proteins; v-cargo – histones, ribosomal proteins
Kap122/Pdr6	-	Imports sc-cargo – Toa1 and Toa2, TFIIA
Kap123	Importin 4	Imports sc-cargo – SRP proteins, histones, ribosomal proteins; v-cargo - Transition Protein 2, histones, ribosomal protein S3a
Kap127/Los1	Exportin-t	Exports tRNAs
Kap142/Msn5	Exportin 5	sc-cargo – imports replication protein A; exports Pho4, Crz1, Cdh1; v-cargo - exports pre-miRNA
Crml/Xpo1	Importin 13 CRM1/Exportin 1	v-cargo – imports UBC9, Y14; exports eIF1A Exports proteins with leucine-rich NES, 60S ribosomal subunits (via NMD3 adaptor), 40S ribosomal subunits

Señales de localización y exporte nuclear (NLS y NES)

Las macromoléculas que van a ser transportadas, también conocidas como moléculas cargo, poseen una NLS o NES que les provee la capacidad de entrar o salir del núcleo respectivamente. La primera NLS identificada y referida como NLS clásica, corresponde a motivos peptídicos cortos que median el importe nuclear de proteínas por unión a sus receptores conocidos como importinas. Las NLS se clasifican en dos categorías: una secuencia simple de 3-5 residuos de aminoácidos básicos (monopartita: PKKKRKV), y una señal bipartita que consiste de un dipéptido básico rio arriba de una secuencia simple básica. Otros tipos de NLS son identificadas

en proteínas hnRNP, ribosomales y U snRNPs. Las secuencias NES ricas en leucinas se han identificado en una gran variedad de proteínas celulares y virales. Estas señales de transporte son reconocidas por receptores de importe y exporte de la familia de la karioperina β (Kap β) (importinas/exportinas), los cuales se mueven entre el núcleo y el citoplasma (Tabla 1) (113).

Señales afines han sido identificadas para algunos de estos receptores, en particular los tipos de NLS clásica son para importinas α/β (114, 115), NLS/M9 y otras señales para transportina (115, 116), y NES para el receptor CRM1 (117). Debido a la capacidad del poro nuclear y receptores asociados para mover los substratos dentro del núcleo o citoplasma en contra de un gradiente, y debido a la dependencia de la hidrólisis del nucleótido trifosfato, el mecanismo ha sido llamado transporte núcleo-citoplásmico activo.

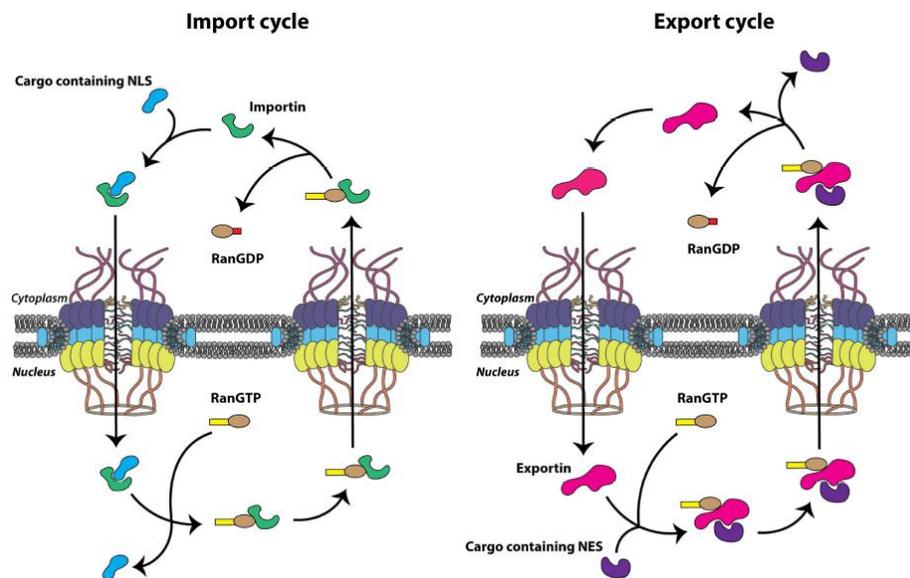


Figura 6. Diagrama que muestra el mecanismo de importe y exporte nuclear y la señalización RanGTP (97).

La interacción de la NLS o NES de las proteínas cargo con sus receptores afines es regulado por una GTPasa pequeña, Ran. El transporte mediado por receptor está dirigido por un gradiente espacial de RanGTP, el cual es alto en el núcleo y bajo en el citoplasma (118). Este gradiente se establece por la localización del factor intercambiador de guanosina RanGEF, RCC1, en el núcleo, y la proteína activadora

de GTPasa RanGAP sobre la cara citoplásmica del poro nuclear. Para el importe nuclear se forma en el citoplasma un complejo receptor-cargo, que es transportado por la RanGTP dentro del núcleo. La pareja receptor-RanGTP después regresa al citoplasma, donde el GTP es hidrolizado y el receptor queda libre para otra ronda de importe. Inversamente, para el exporte nuclear, un complejo trimérico se forma en el núcleo, y pasa a través del poro nuclear rompiéndose al llegar al citoplasma cuando el GTP es hidrolizado. El receptor de exporte vuelve a entrar al núcleo vacío de carga. Ya que ambos tipos de receptores son esenciales para el exporte de RanGTP, un receptor distinto es requerido para mantener el nivel nuclear de Ran. NTF2 se une a RanGDP y lo libera por el intercambio a GTP (115, 119). En estos ciclos de transporte, el gradiente de RanGTP es fundamentalmente responsable para el transporte direccional a través del poro, y la hidrólisis de GTP se encuentra estrechamente acoplada a la traslocación (Fig. 6). El principal receptor de importe, importina $\beta 1$ (Kap $\beta 1$), normalmente opera como un heterodímero con una molécula adaptadora, importina α (Kap α). Las isoformas de α después reconocen diferentes NLS, incrementando la versatilidad del receptor $\beta 1$ (115, 121). En el núcleo solo importina β interactúa directamente con RanGTP. La unión de GTP libera el complejo α -NLS; α después se une a diferentes receptores, CAS es un exportador para α (Tabla 1). Por lo tanto en los ciclos de transporte, normalmente se requieren dos moléculas de RanGTP para el importe de una sola proteína cargo por la importina $\beta 1$, aunque ciertos substratos pueden unirse directamente a $\beta 1$ sin un adaptador a través de su NLS y pasar con facilidad a través del complejo del poro nuclear (115, 122) (Fig. 6).

Complejo de poro nuclear (NPC)

Los poros nucleares están formados por una estructura conocida como el complejo del poro nuclear (NPC). El NPC de los vertebrados, posee una masa molecular total de 125 mDa y está constituido por aproximadamente 100 proteínas conocidas como nucleoporinas (Nups) (Tabla 2), aunque algunas evidencias sugieren que esta composición puede variar entre tipos celulares y tejidos.

Tabla 2. Nucleoporinas homologas en levaduras y vertebrados (125).

Subestructura del NPC	Componentes en levadura	Componentes en vertebrados
<i>Anillo externo</i>	Subcomplejo Nup84 (Nup84, Nup85, Nup120, Nup133, Nup145C, Sec13, Seh1)	Complejo Nup107-160 (Nup160, Nup133, Nup107, Nup96, Nup75, Seh1, Sec13, Aladin, Nup43, Nup37)
<i>Anillo interno</i>	Subcomplejo Nup170 (Nup170, Nup157, Nup188, Nup192, Nup59, Nup53)	Subcomplejo Nup155 (Nup155, Nup205, Nup188, Nup35)
<i>Nups FG citoplásmicas y de filamentos</i>	Nup159, Nup42	Nup358, Nup214, Nlp1
<i>Anillo luminal</i>	Ndc1, Pom152, Pom34	Gp210, Ndc1, Pom121
<i>Nups FG simétricas</i>	Nsp1, Nup57, Nup49, Nup145N, Nup116, Nup100	Nup62, Nup58/45, Nup54, Nup98
<i>Nups de enlace o unión</i>	Nup82, Nic96	Nup88, Nup93
<i>Nups FG nucleoplásmicas y de filamentos</i>	Nup1, Nup60, Mlp1, Mlp2	Nup153, TPR

Los poros nucleares tienen una estructura simétrica con filamentos sobre ambos lados, y en el lado localizado hacia el nucleoplasma forma una estructura en forma de canasta (123) (Fig. 7). El NPC media el transporte bidireccional entre el citoplasma y el núcleo, proporcionando canales acuosos que permiten el paso de pequeñas y grandes moléculas. El diámetro del canal del NPC a través del cual el transporte activo ocurre puede abrirse a un máximo de 25 nm, mientras que el canal de difusión a través del cual el transporte de iones y moléculas pequeñas ocurre es de 9 nm. Estudios de cinética han demostrado que 1000 translocaciones por segundo ocurren por cada NPC. El mantenimiento de su alta selectividad y al mismo tiempo permitir un rápido desplazamiento, hacen del NPC una eficiente nanomáquina química (124).

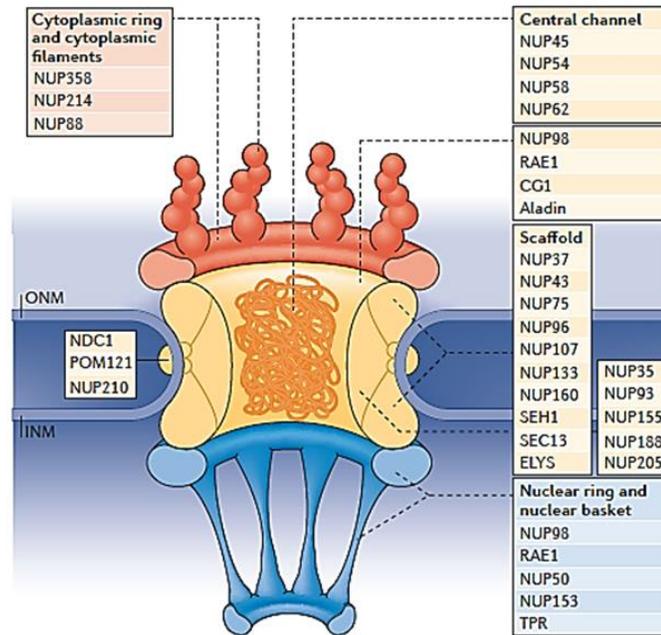


Figura 7. Representación esquemática de la localización de nucleoporinas dentro del complejo del poro nuclear (128).

Por microscopía electrónica, los NPCs aparecen como estructuras cilíndricas en el plano de la envoltura nuclear. Cada NPC consiste de tres anillos: citoplásmico, nuclear y un anillo central posicionado entre el anillo citoplásmico y el anillo nuclear. El anillo citoplásmico está decorado por ocho filamentos y la formación de una canasta unida a un anillo nuclear (115) (Fig. 8). Se han encontrado diferentes nucleoporinas en los filamentos citoplásmicos, en el anillo nuclear y comparativamente algunas pocas en el anillo central, dentro de las que destacan la Nup358 y Nup214 en los filamentos citoplásmicos, un complejo de nucleoporinas, p62/58/54/45 que es localizado en la región central, y a través de éste ocurre el transporte núcleo-citoplásmico. En la región nuclear se localizan las nucleoporinas Nup98 y Nup153 que tienen péptidos repetidos, siendo esta última nucleoporina, Nup153 una de las principales durante el transporte núcleo-citoplásmico debido a su habilidad para moverse a través del NPC, debido a la presencia de su dominio M9 que le confiere esta capacidad (Fig. 8).

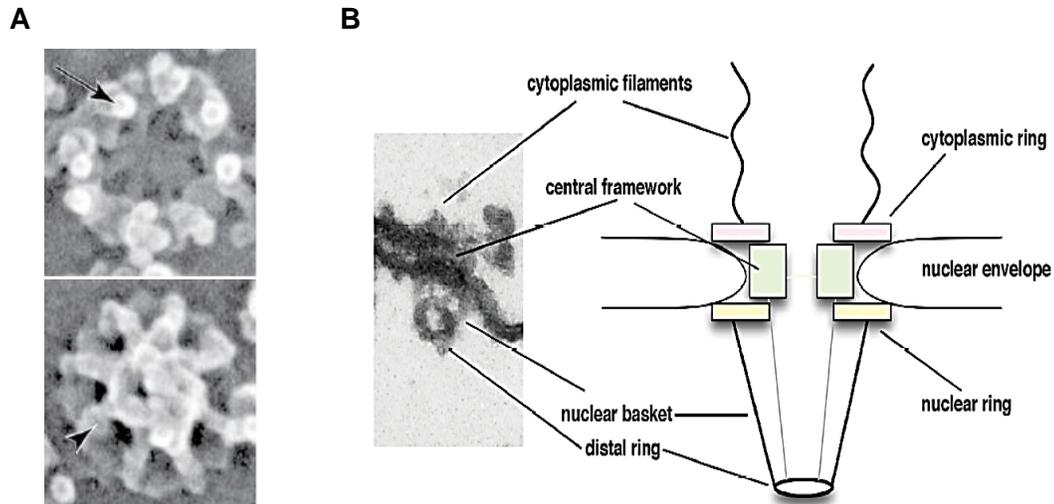


Figura 8. Microscopía electrónica de barrido (A), y de transmisión (B) del NPC, y una representación esquemática de sus componentes (B) (126, 127).

Análisis bioquímicos y funcionales han demostrado que las Kap β (karyoperinas β : primer receptor nuclear identificado) se encuentran unidas a las nucleoporinas, mostrando que Kap β 1 y Kap β 2 median las vías de importe nuclear convergiendo con Nup153. El sitio de unión Nup153/ Kap β es un dominio de movimiento M9 presente en Nup153, y que es reconocido por el receptor de NLS, Kap α (proteína adaptadora de Kap β 1) (115). Aunque son numerosas las moléculas que participan durante el transporte núcleo-citoplásmico, como lo son las nucleoporinas, la alteración en una de estas proteínas podría provocar un bloqueo parcial o total en la dinámica de este complejo transporte, particularmente en aquellas proteínas con una importante participación como lo son la Nup270 y Nup153, que son esenciales para este transporte al interactuar con los receptores de la familia de las importinas y exportinas (115, 127).

Alteraciones en el transporte núcleo-citoplásmico

La regulación de la maquinaria de transporte provee una forma simple para coordinar el control del transporte de múltiples moléculas cargo. Para que las células respondan a diferentes estímulos y señales ambientales, tales como infecciones por algunos patógenos, pueden ocurrir cambios transcripcionales y post-transcripcionales dentro del núcleo para iniciar la respuesta celular apropiada. La regulación de las

respuestas inmunes innatas a patógenos ocurre a múltiples niveles, incluyendo al nivel de tráfico núcleo-citoplásmico, por lo que la exportación nuclear de mRNAs que codifican proteínas de defensa celular es crítica para una respuesta del huésped a la invasión de patógenos.

Muchos virus usurpan o alteran las funciones nucleares para beneficiar su replicación y transmisibilidad. Además, los virus han revelado la identidad de varias proteínas celulares importantes para el tráfico núcleo-citoplásmico, incluidas los factores de exportación nuclear CRM1 (también conocido como exportina 1, XPO1) y NXF1 (factor de exportación nuclear 1, también conocido como TAP, Proteína asociada a TIP), que se descubrieron durante estudios de exportación de RNA viral (129, 130, 131). Estos dos receptores nucleares de exportación son manipulados por muchos virus de DNA y RNA para promover el exporte del RNA viral y/o inhibir el tráfico de mRNA del huésped. También se sabe que múltiples virus, incluyendo algunos que se replican exclusivamente en el citoplasma, restringen la exportación de mRNA del huésped al citoplasma usando diferentes mecanismos y provocando una restricción clave para inhibir la expresión de genes del huésped. Si bien la inhibición del exporte nuclear es crucial para promover una infección viral exitosa, la inhibición del importe nuclear parece ser también importante, debido a que, a través de esta inhibición se pueden bloquear las señales de la respuesta inmune desde el citoplasma hacia el núcleo que generalmente son activadas durante una infección viral. Aunque aún no es bien comprendido, la inhibición del importe nuclear también puede traer como consecuencia la acumulación de proteínas nucleares en el citoplasma, específicamente proteínas de unión a RNA que son importantes para la biogénesis de los mismos, y que algunas de ellas han sido descritas como componentes necesarios para la traducción y replicación de algunos virus (Tabla 3) (132-134).

Tabla 3. Proteínas residentes del núcleo involucradas en la traducción de los picornavirus (97).

Nuclear-resident protein	Picornavirus IRES type	Effect	References
Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTBP1)	I, II, III	Promotes translation through stabilization of IRES structure	Jang and Wimmer, 1990; Luz and Beck, 1991; Chang et al., 1993; Hellen et al., 1993; Kaminski et al., 1995; Kolupaeva et al., 1996; Niepmann, 1996; Pestova et al., 1996; Hunt and Jackson, 1999; Gosert et al., 2000a; Song et al., 2005; Kafasla et al., 2009, 2010; Verma et al., 2010; Kafasla et al., 2011
Lupus La protein (La)	I, II, III	Stimulates translation from Type I and Type II IRESs; suppresses translation from Type III IRES structures	Meerovitch et al., 1989, 1993; Craig et al., 1997; Kim and Jang, 1999; Ray and Das, 2002; Costa-Mattioli et al., 2004; Cordes et al., 2008
Poly(rC)-binding protein 2 (PCBP2)	I, III	Stimulates translation from Type I and Type III IRESs but does not bind Type II IRES element	Blyn et al., 1995, 1996; Gamarnik and Andino, 1997; Parsley et al., 1997; Graff et al., 1998; Zell et al., 2008a,b; Sean et al., 2009; Sweeney et al., 2014
Serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3 or SRp20)	I	Acts synergistically with PCBP2 to increase efficiency of coliovirus translation	Bedard et al., 2007; Fitzgerald and Semler, 2011
Proliferation-associated protein 2G4 (PA2G4 or EBP1)	II	Necessary for FMDV translation but not required for TMEV or EMCV translation	Pilipenko et al., 2000; Monie et al., 2007
Nucleolin	I	Stimulates translation	Waggoner and Sarnow, 1998; Izumi et al., 2001
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1)	I	Interacts with EV71 IRES, depletion results in reduced reporter gene translation	Lin et al., 2009b
Far upstream element-binding protein 1 (FBP1)	I	Interacts with EV71 IRES	Huang et al., 2011
KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1 (Sam68)	II	Promotes FMDV translation	Lawrence et al., 2012
Double-stranded RNA binding protein 76 (DRBP76)	I	Heterodimerizes with nuclear factor of activated T-cells, 45 KDa (NF45) and inhibits HRV 2 translation	Merrill et al., 2006; Merrill and Gromeier, 2006
Far-upstream element-binding protein 2 (FBP2)	I	Inhibits EV71 IRES-driven translation	Lin et al., 2009a; Chen et al., 2013
AU-rich binding factor 1 (AUF1 or hnRNP D0)	I	Binds IRES element and inhibits translation	Cathcart et al., 2013; Wong et al., 2013; Lin et al., 2014
Gem-associated protein 5 (Gemin5)	II	Likely inhibits FMDV translation through competitive inhibition of PTBP1 binding	Piñeiro et al., 2013

Alteraciones del transporte nucleo citoplásmico durante la infección con picornaviurs

El genoma de los virus de la familia *Picornaviridae*, es un RNA de sentido positivo competente para la traducción inmediata de sus proteínas una vez alcanzando el citoplasma. Este es promovido por la presencia de una región de unión interna al ribosoma o IRES, (por sus siglas en inglés: Internal Ribosome Entry Site) que interacciona con factores canónicos y no canónicos para promover el inicio de la síntesis de proteínas de manera independiente de cap (96). Los IRES de tipo I y tipo II han sido los más ampliamente estudiados en picornavirus, y en consecuencia, se ha demostrado que se asocian con un gran número de componentes nucleares en comparación con otros tipos IRES. Entre los diferentes componentes nucleares reportados que interactúan y promueven la traducción viral dependiente de IRES y que aparentemente también promueven la replicación del virus, se encuentran las proteínas PTBP1 (proteína 1 de unión al tracto de polipirimidinas o hnRNP I), La (el autoantígeno La), Sam68, PCBP2 (proteína 2 de unión a poli C), SRSF3 (factor splicing 3 rico en serinas/argininas) y PA2G4 (proteína 2G4 asociada a proliferación) (Tabla 3). Para ello, algunas de ellas son notablemente localizadas en el citoplasma durante la infección, lo cual sugería una alteración en su transporte hacia el núcleo, que trae como consecuencia su acumulación en el citoplasma (97, 98, 99, 100, 101).

Entre los picornavirus que se sabe que interfieren con el tráfico núcleo-citoplásmico, se encuentran el poliovirus (PV), el rinovirus humano (HRV), el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV) y el virus de la encefalomiocarditis (EMCV), a través de la degradación o fosforilación de las nucleoporinas. Durante la infección por PV o HRV, se induce una severa degradación de las nucleoporinas, particularmente de las Nup358, Nup214, Nup153, Nup98 y Nup62, lo cual ocasiona una fuerte alteración del transporte núcleo-citoplasma y como consecuencia, la acumulación anormal y masiva de proteínas nucleares en el citoplasma (102, 103, 104, 105, 106). Inicialmente se propuso que la manera en la que podría ocurrir esta degradación de nucleoporinas durante la infección, era debido a la acción de caspasas activadas como consecuencia de la inducción de apoptosis durante la infección, ya

que se conocía que la redistribución de proteínas implicadas en el transporte nuclear como la proteína nuclear Ran, los factores de unión a nucleoporinas como los receptores citoplásmicos importina α y β , así como el procesamiento de algunas nucleoporinas como la Nup153, eran resultado del establecimiento de la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, se determinó que las células deficientes de caspasa-9 y -3, no mostraban diferencias en la permeabilidad del NPC en comparación con las células que expresan niveles normales de caspasas, cuando ambas son infectadas con poliovirus, sugiriendo que el incremento en la permeabilidad del NPC, y el procesamiento de las nucleoporinas durante la infección por poliovirus, era independiente de la acción de las caspasas (138). Posteriormente, se identificó que las dos proteasas virales son las responsables de la degradación de las nucleoporinas en la infección por picornavirus. La proteasa 2A, siendo responsable de la degradación de las Nup98, Nup62 y Nup153 (106), mientras que la proteasa 3C degrada a las Nup358, Nup214 y a la mencionada Nup153 (Fig. 9) (102, 104, 105, 135).

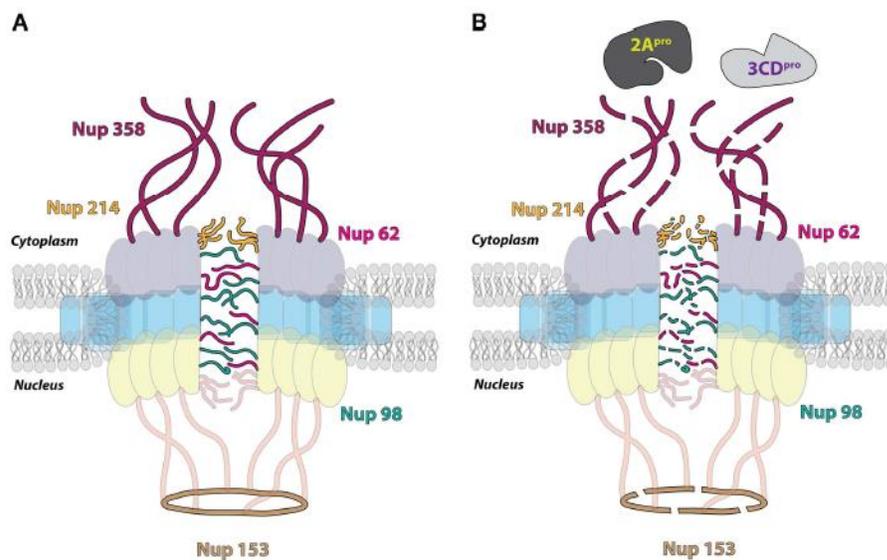


Figura 9. Representación esquemática de la alteración del NPC por enterovirus. (A) Se muestran las regiones del NPC y la localización de las 5 nucleoporinas blanco, y (B) su procesamiento por las proteasas virales (97).

Además del procesamiento de nucleoporinas en la infección por enterovirus, se han descrito otros mecanismos que algunos virus emplean para alterar a las

nucleoporinas, incluso dentro de la misma familia *picornaviridae*, como ocurre con el EMCV y el TMEV (Tabla 4).

Tabla 4. Nucleoporinas alteradas por algunos virus (139).

Nucleoporin	Enterovirus	Cardiovirus	Adenovirus	HIV-1
Nup62	Proteolysis (Gustin and Samow, 2001; 2002)	Hyperphosphorylation (Porter and Palmenberg, 2009)	Displacement from NPC (Strunze et al., 2011)	Displacement from NPC Abundance decreased ¹ (Monette et al., 2009; 2011)
Nup98	Proteolysis (Park et al., 2008)	Hyperphosphorylation (Ricour et al., 2009)	Unknown	Abundance increased ² (Monette et al., 2011)
Nup153	Proteolysis (Gustin and Samow, 2001; 2002)	Hyperphosphorylation (Porter and Palmenberg, 2009)	No effect (Strunze et al., 2011)	Abundance decreased (Monette et al., 2011)
Nup214	Proteolysis(Ghildyal et al., 2009)	Hyperphosphorylation (Porter and Palmenberg, 2009)	Displacement from NPC (Strunze et al., 2011)	Abundance unchanged (Monette et al., 2011)
Nup358	Proteolysis (Ghildyal et al., 2009)	No effect (Porter and Palmenberg, 2009)	Displacement from NPC (Strunze et al., 2011)	Abundance unchanged (Monette et al., 2011)

Proteínas nucleares que interactúan con los genomas de los Calicivirus

La participación de proteínas celulares en la traducción y replicación de los calicivirus, al igual que lo que ocurre durante la infección con otros virus, comienza a describirse. En trabajos realizados en nuestro laboratorio, se determinó que las proteínas nucleares PTB, La, hnRNP L, hnRNP A1, PCBP2 y nucleolina, interactúan con elementos presentes en las regiones 5' y 3' del RNA genómico del virus Norwalk, el MNV y el FCV (87, 88, 89, 90, 91, 92). Asimismo, el grupo de Goodfellow y cols, demostró que la proteína PTB, funciona como un regulador negativo de la traducción de las proteínas virales, y como promotor para la síntesis de RNA del FCV, lo cual es favorecido por la localización de esta proteína en el citoplasma de las células infectadas. Sin embargo, el mecanismo a través del cual esta proteína se encuentra en mayor cantidad en el citoplasma de las células infectadas aun es desconocido (89). Por otro lado, se observó que las proteínas PCBP2 y hnRNP A1, se localizan en el citoplasma de las células infectadas con el MNV, y se propuso que ambas proteínas participan en la circularización del genoma viral, promoviendo una eficiente replicación viral (90).

En los ensayos realizados durante mi trabajo de tesis de maestría titulado “Estudio del transporte núcleo-citoplásmico durante la infección por calicivirus”,

identificamos que durante la infección por el FCV y el MNV, las proteínas nucleares hnRNP A1, Sam68 y nucleolina, de localización nuclear, se dispersan en el citoplasma de las células infectadas, lo cual sugería que como en el caso de la infección por picornavirus, el transporte núcleo-citoplasma de estas tres proteínas nucleares, estaba alterado durante la infección por los calicivirus. Para saber la razón de esta localización inusual de proteínas nucleares, se analizó la integridad de las nucleoporinas con un anticuerpo que detecta una región conservada denominada FXFG, y se encontró que, durante la infección por el FCV y el MNV ocurría la pérdida y/o procesamiento de algunas nucleoporinas, lo cual coincidía en el mismo tiempo de infección con la localización citoplásmica de hnRNP A1, Sam68 y nucleolina.

Aunque algunas de las nucleoporinas no pudieron ser identificadas con anticuerpos específicos, encontramos una coincidencia entre las que se procesan en la infección por los calicivirus, y las reportadas que se degradan durante la infección por los picornavirus, por acción de sus proteasas virales 2A y 3C. Por tal motivo, y debido a la gran similitud que presentan la proteasa 3C de los picornavirus y la proteasa NS6 de los calicivirus (142, 142), es posible que las nucleoporinas estén siendo procesadas por la proteasa viral NS6 durante la infección, y de esta forma estén alterando el transporte núcleo-citoplasma. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, también se sabe que durante la apoptosis, los componentes móviles del sistema de transporte, los receptores de transporte, los miembros del ciclo de las RanGTPasas y las nucleoporinas del NPC, se pueden alterar por acción de las caspasas activadas (136). Dado que durante la infección por los calicivirus la apoptosis intrínseca o mitocondrial, es activada como una estrategia del virus para promover la salida de la progenie viral (140), es posible que el procesamiento de las nucleoporinas también pueda ser una consecuencia de la actividad de las caspasas activadas durante la infección por los calicivirus.

JUSTIFICACION

Durante la infección por los calicivirus, se ha detectado la presencia de proteínas nucleares en el citoplasma celular que participan en su ciclo replicativo, como lo son las proteínas PTB y hnRNP A1. La localización inusual de estas proteínas, podría ser una consecuencia de la alteración del transporte núcleo-citoplásmico, particularmente debido al procesamiento específico de algunas nucleoporinas del complejo del poro nuclear. El identificar a las nucleoporinas que están siendo alteradas y el mecanismo por el cual se están procesando, permitirá conocer algunas de las estrategias que emplean los calicivirus para su replicación.

HIPOTESIS

La infección con el FCV altera la integridad de las nucleoporinas como una estrategia para tener acceso a proteínas nucleares implicadas en su replicación.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la integridad y el mecanismo por el cual se altera la función de las nucleoporinas durante la infección por el calicivirus felino.

Objetivos específicos

1. Analizar la integridad de las nucleoporinas a tiempos tempranos, intermedios y tardíos de la infección por el FCV.
2. Determinar las probables moléculas responsables del procesamiento de las nucleoporinas durante la infección.
3. Analizar el papel de la proteína LC del FCV en la inducción de la apoptosis y el procesamiento de las nucleoporinas.
4. Analizar el papel de la proteasa viral NS6/7 en el procesamiento de las nucleoporinas.

MATERIALES Y METODOS

Células y virus

La cepa F9 de calicivirus felino se propagó en células de riñón felino Crandell-Rees (CrFK) obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD). Se cultivaron las células CrFK a 37°C con CO₂ al 5% en medio de mantenimiento que contenía el medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) con la adición de penicilina (5000 U), estreptomocina (5 g/ml), aminoácidos no esenciales (0.1 mM), Glutamina (2 mM) y se suplementó con suero fetal bovino al 5% (SFB). Las células HEK293T obtenidas de la ATCC, utilizadas para los ensayos de transfección, se cultivaron en medio DMEM con 10% de SFB, penicilina (100 µg/ml), estreptomocina (100 µg/ml) y anfotericina B (250 ng/ml).

Efecto citopático y ensayo de plaqueo

El efecto citopático (CPE) se monitoreo a los tiempos de infección indicados mediante la evaluación de la morfología celular utilizando un microscopio de campo claro. Los títulos del virus en los sobrenadantes recogidos de las células infectadas y/o tratadas con los diferentes inhibidores de proteasas, se determinaron mediante un ensayo en placa (143).

Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados para los ensayos de Western blot (WB) e inmunofluorescencia (IF), fueron: anti-hnRNP I o PTB (SC-16547), anti-hnRNP A1 (SC-32301), anti-TPR o Nup270 para WB (SC-271317), y para IF (SC-67116), anti-nucleoporina p62 o Nup62 (SC-25523), anti-Nup98 (SC-74578), anti-proteínas del complejo del poro nuclear o Mab414 (ab24609 Abcam), anti-Nup153 (ab96462 Abcam), anti-Caspasa-3 (9662S cell signaling), anti-PARP (9542 cell signaling), los anticuerpos para las proteínas virales anti-NS6/7 y anti-NS3 fueron amablemente donados por Ian Goodfellow de la Universidad de Cambridge, UK, y el anti-actina fue amablemente donado por Manuel Hernández, del Cinvestav, Mexico.

Western blot

Monocapas confluentes de células CrFK, se infectaron o no (mock), con el FCV cepa F9 a una multiplicidad de infección (MOI) de 5. Las células se lisaron y se recolectaron a los diferentes tiempos post-infección (1, 3, 5, 7 y 9 hpi), utilizando el buffer de muestra Laemmli, y posteriormente se hirvieron durante 10 minutos. Los lisados celulares se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Millipore). La membrana se bloqueó con leche al 5% en TBS-Tween (TBS-T) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo primario indicado (anti-Nup270, -Nup153, -Nup98, -Nup62, -Caspasa-3, -PARP, -actina, -NS6/7 y/o -NS3), durante toda la noche a 4°C. Para el análisis con el Mab414, los extractos se separaron utilizando un gel de gradiente que va del 5-15%, para poder visualizar las diferentes proteínas que reconoce el anticuerpo. Se realizaron 3 lavados con TBS-T por 10 minutos cada uno. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario apropiado anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology), diluyéndose en TBS-T con leche al 5% por 2 horas, a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con TBS-T por 10 minutos cada uno. Las proteínas se detectaron utilizando el kit de quimioluminiscencia Super-signal West-Femto, Pierce.

Inmunofluorescencia - Microscopia confocal

Las células CrFK se crecieron sobre cubre objetos, y se infectaron o no (mock) con el FCV a una MOI de 5, a los diferentes tiempos post-infección (1, 3, 5, 7 y 9 hpi). Las células se trataron con buffer de citoesqueleto (CB) (MES 10 mM, NaCl 150 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 5 mM, y glucosa 5 mM) durante 5 minutos. Las células se fijaron y permeabilizaron con una solución de para-formaldehído al 4% que contiene Triton X-100 0.2% (PFA-T) durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos, y se trataron nuevamente con una solución de PFA al 4% durante 20 minutos. Las células se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos, y enseguida se trataron con una solución bloqueadora de gelatina (G8150-100G, Sigma) al 0.5% en PBS, durante 40 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos, y se incubaron con el respectivo

anticuerpo primario (anti-Nup270, -Nup153, -Mab414, -hnRNP A1, -PTB, -NS3 y -NS6/7), durante toda la noche a 4°C. Las células se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos, y se incubaron con el apropiado anticuerpo secundario conjugado a un Alexa 488 o Alexa 594 (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora a temperatura ambiente y a 37°C para los correspondientes a VP1, NS3 y NS6/7. Las células se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos, y el núcleo de las células fue teñido utilizando DAPI (1µg/ml) durante 90 segundos (Fisher Scientific). Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos, y las laminillas se montaron sobre portaobjetos utilizando vectashield (Sigma) y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Las imágenes de las células fluorescentes se capturaron usando el microscopio confocal de escaneo-laser ZEISS LM700 (CLSM).

Ensayos de inhibición

Las células CrFK se infectaron o no (mock) con el FCV a una MOI de 5, en presencia o ausencia de los diferentes inhibidores de proteasas (Z-VAD-fmk, Ac-DEVD-CHO, ZnCl₂, E64, Aprotinina, Pefabloc y Leupeptina), y se analizaron por western blot y/o Inmunofluorescencia. Las células CrFK se trataron con el inhibidor Z-VAD-fmk (Promega #G7232) a una concentración de 500µM durante 4 horas antes de ser infectadas (pre-tratamiento), después el medio con el inhibidor se retiró de las células, y enseguida se infectaron siguiendo la misma metodología descrita anteriormente. Para los tratamientos con Ac-DEVD-CHO (200 µM) (Promega #G5961), y el set de inhibidores E64 (140 µM), Aprotinin (1.5 µM) y Leupeptin (50 µM) (Protease Inhibitors Set, Roche, Cat. No. 1206893), las células CrFK se infectaron previamente y a partir del tiempo 0 de infección se trataron con las diferentes concentraciones de cada inhibidor. Las células para inmunofluorescencia, y los extractos celulares para western blot, se recolectaron a los diferentes tiempos post-infección (1, 3, 5, 7 y 9 hpi) para su análisis.

PCR - Amplificación y clonación de la proteína LC

Se analizó la secuencia del genoma completo del FCV (GenBank. M86379.1), se localizó la región correspondiente al ORF2, y dentro de esta se identificó la secuencia de la proteína LC previamente reportada (30). A partir de la secuencia nucleotídica de LC, se diseñaron un par de oligonucleótidos para expresión en procariotas, con los sitios de restricción para las enzimas BamHI (GGATCC) y EcoRI (GAATCC); y otro par para la expresión en eucariotas con los sitios de restricción para las enzimas HindIII (AAGCTT) y BamHI (GGATCC).



La secuencia de la proteína LC se amplificó por la técnica de PCR, el amplicón de 372 pares de bases (124 aminoácidos) obtenido con los dos pares de oligonucleótidos, se clonó en el vector de tránsito pJET1.2/blunt (Thermo Scientific, K1231). Se liberó el inserto correspondiente a la secuencia de LC realizando un ensayo de restricción con las enzimas correspondientes. El inserto correspondiente se clonó en el vector de expresión eucariota pcDNA 3.1 (-), y en el vector de expresión procariota pGEX-5X-1; ambas construcciones se secuenciaron. La construcción LC-pcDNA 3.1 (-) fue utilizada para realizar los ensayos de transfección en células CrFK. La construcción LC-pGEX-5X-1 se utilizó para la inmunización de ratones y la producción del anticuerpo contra la proteína LC del FCV.

Inducción de la proteína LC y producción del anticuerpo anti-LC

Bacterias BL21 se transformaron con el plásmido LC-pGEX-5X-1. Se realizó la inducción de la proteína utilizando una concentración de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) de 0.1 mM. La inducción de la proteína se realizó cada hora durante 4 h y una de 12 h a 37°C en agitación suave. La expresión de la proteína se analizó mediante SDS-PAGE y tinción del gel con azul de coomassie. Para obtener la proteína recombinante de la fracción soluble, el volumen total del cultivo inducido se centrifugó a 5 000 rpm durante 30 minutos. La pastilla resultante se lavó con el buffer STE (Tris HCl 10 mM pH8, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM), y se centrifugó a 8 000 rpm por 5 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió en el buffer de lisis de STE y lisozima (100 mg/ml), y se colocó en hielo durante 15 minutos. Se adicionó una concentración final de 5 mM de DTT, 15 mM de PMSF y 1.5% (w/v) de Sarkosyl. Las bacterias se sonicaron 30 segundos en hielo (3 veces), y se centrifugaron a 13 000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó Tritón X-100 al 3%, mientras que la pastilla se resuspendió en PBS-Tritón X-100. La proteína contenida en la fracción de sobrenadante, se interaccionó con perlas de Glutión-Agarosa (Sigma, G4510) durante toda la noche a 4°C en constante movimiento. Se centrifugaron a 5 000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se almacenó a -80°C, mientras que las perlas se lavaron con PBS-Triton X-100 (3 veces). El sobrenadante se eliminó y las perlas se resuspendieron en 500 μ l del buffer de elución (Tris HCl pH8 50 mM, glutatión reducida 15 mM), se centrifugó a 3 000 rpm 5 minutos, y el sobrenadante resultante es la proteína eluída (este paso se repitió las veces que fueron necesarias para obtener el volumen suficiente de proteína). Se cuantificaron las eluciones.

La elución de la proteína LC fusionada a GST obtenida a partir del plásmido pGEX-5X-1, se utilizó para inmunizar dos ratones BALBC con una concentración de 150 μ g para cada ratón. Se realizaron 3 inmunizaciones (en un periodo de 3 semanas), y se realizó el sangrado directamente del corazón. La sangre fue tratada de acuerdo al protocolo establecido para la obtención del suero inmune.

Transfección de las proteínas virales LC y NS6/7

El plásmido LC-pcDNA 3.1 (-) se transfectó en células CrFK a diferentes concentraciones (1, 5, 6, 8 y 10 µg), utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen, 11668-019) siguiendo el protocolo del fabricante. Las células a 12, 24 y 48 horas post-transfección fueron recolectadas para obtener extractos totales, y analizarse por western blot.

El plásmido pmCherry C1 vacío, y las construcciones pmCherry C1-NS6 y pmCherry C1-NS6/7 fueron amablemente donados por Edward Emmott e Ian Goodfellow de la Universidad de Cambridge, UK. Los plásmidos se transfectaron en células HEK293T cultivadas sobre cubre objetos previamente tratados con poli-L lisina. Se transfectaron 2 µg de cada plásmido, siguiendo la misma metodología de lipofectamina 2000. Las células después de 16 y 24 horas post-transfección, se analizaron por inmunofluorescencia usando microscopía confocal (CLSM).

RESULTADOS

La infección con el FCV provoca el procesamiento de algunas nucleoporinas

La localización citoplásmica de proteínas nucleares como una consecuencia de la infección por los calicivirus, aunque ha sido pobremente descrita, parece ser un importante evento durante la replicación viral, como ocurre con algunos virus de RNA. En la infección por los picornavirus, ocurre una alteración del tráfico núcleo-citoplasma debido a la acción de las proteasas virales, que trae como consecuencia la presencia de proteínas nucleares en el citoplasma implicadas en la regulación de la traducción y replicación viral (99, 103). En la infección por los calicivirus, se ha reportado la localización en citoplasma de las proteínas nucleares PTB y hnRNP A1 (89, 90). Además, se sugirió una modificación específica del tráfico núcleo-citoplasma que altera la localización de PTB, sin embargo, no hay evidencia experimental de que esto ocurra. Debido a que las nucleoporinas del NPC son responsables del transporte núcleo-citoplásmico, se analizó su integridad durante la infección por el FCV.

Monocapas de células CrFK se infectaron o no (mock) con el FCV a una MOI de 5, y los lisados celulares obtenidos a 1, 3, 5, y 7 horas post-infección (hpi) se sometieron a un SDS-PAGE usando un gel de gradiente (5-15%). Se analizó la integridad de las nucleoporinas por western blot utilizando el anticuerpo Mab414 que reconoce el dominio conservado FXFG presente en la Nup358, Nup270, Nup214, Nup153, Nup98 y Nup62. En las células no infectadas (mock), se detectaron 6 bandas en los pesos moleculares correspondientes a las diferentes nucleoporinas antes mencionadas (Fig. 10A). Un patrón similar fue observado en las células infectadas por 1 hora, sin embargo, a las 3, 5 y 7 hpi se observó el procesamiento y pérdida progresiva de las bandas correspondientes a las Nup358, Nup270, Nup214 y Nup153, lo cual coincidió con la presencia de la proteína viral NS6/7 desde las 3 hpi (Fig. 10A). Por otro lado, las bandas correspondientes a la Nup62 y Nup98 parecen no ser afectadas durante la infección por el FCV. Se utilizó actina como control de carga (Fig. 10A).

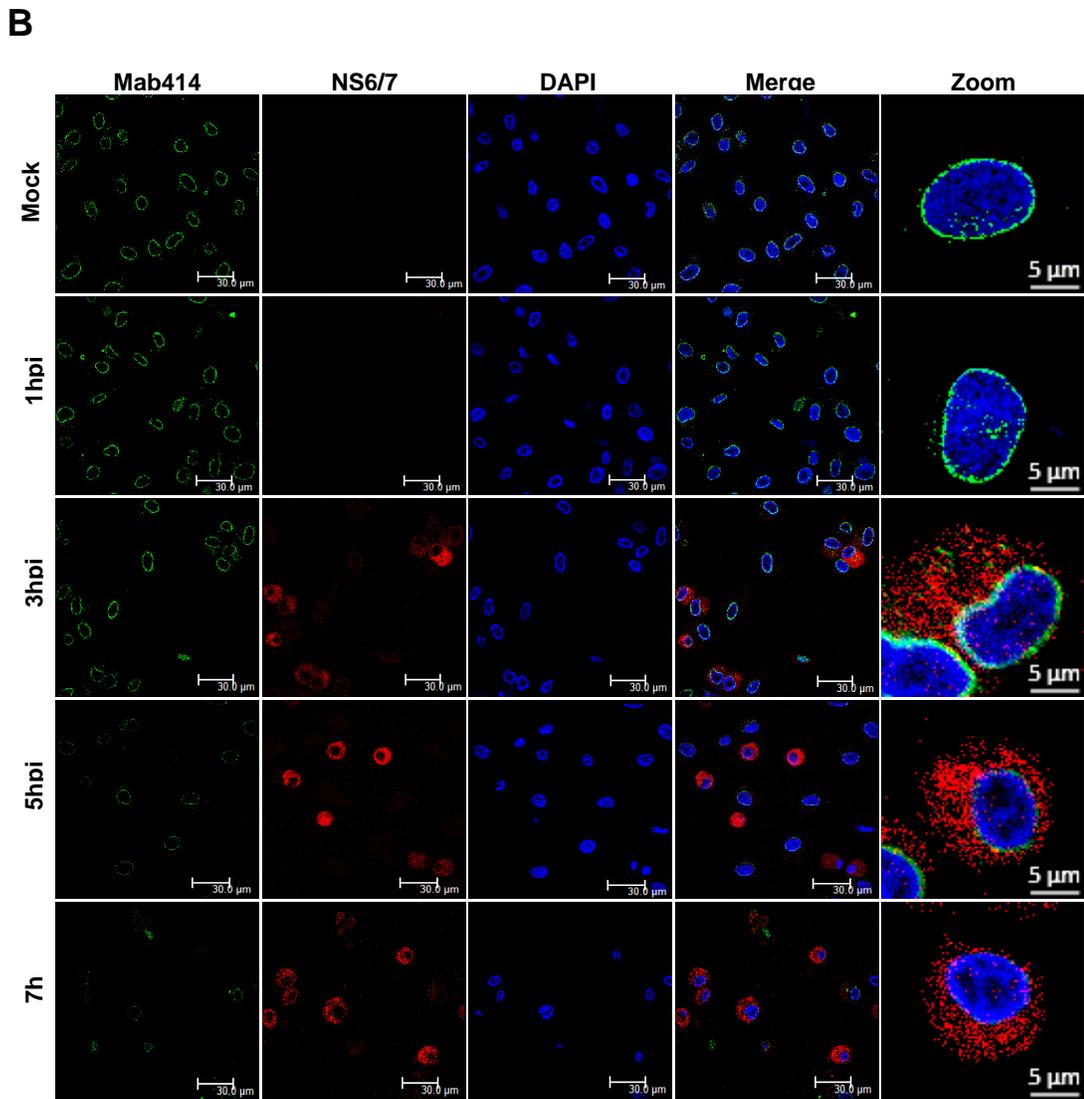
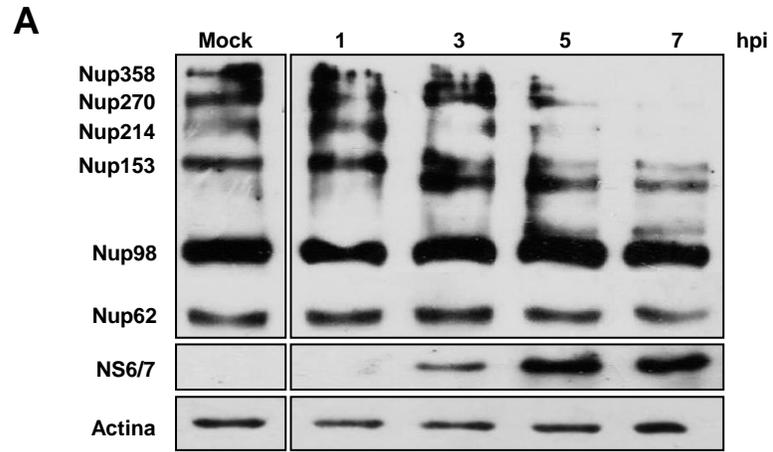


Figura 10. Procesamiento de nucleoporinas durante la infección por el FCV. (A) Células CrFK se infectaron con el FCV (MOI de 5) o no (mock), y se lisaron usando el buffer de Laemli a los tiempos que se muestran (1, 3, 5 y 7 hpi). Los lisados celulares se sometieron a SDS-PAGE en un gel de gradiente del 5-15%, y se analizaron por western blot utilizando los anticuerpos anti-nucleoporinas, anti-NS6/7 y anti-actina como control de carga. (B) Células CrFK se cultivaron sobre cubre objetos y se infectaron con el FCV (MOI de 5) o no (mock) a 1, 3, 5 y 7 hpi, se fijaron y permeabilizaron, y se tiñeron con los anticuerpos dirigidos contra las nucleoporinas-FG (Mab414, verde) y la proteasa-polimerasa NS6/7 (rojo). Los núcleos de las células se tiñeron con DAPI (azul). Las imágenes fueron capturadas usando el CLSM (ver materiales y metodos)

Para confirmar este resultado, monocapas de células CrFK se cultivaron en sobre cubreobjetos, y se infectaron o no (mock) con el FCV a una MOI de 5, se analizaron a 1, 3, 5 y 7 hpi con la técnica de inmunofluorescencia indirecta, para la detección de nucleoporinas usando el anticuerpo Mab414 (verde) que reconoce a las 6 diferentes nucleoporinas. Se identificó la localización perinuclear característica de estas proteínas en las células no infectadas (mock), así como en las infectadas durante 1 h (Fig. 10B), mientras que en las células a partir de las 3 hpi se encontró una alteración y reducción significativa en el marcaje de las nucleoporinas, el cual fue más evidente a las 5 y 7 hpi (Fig. 10B). El anticuerpo contra la proteasa-polimerasa viral NS6/7 (rojo) se utilizó para demostrar la infección viral, confirmando la alteración de algunas nucleoporinas durante la infección con el FCV (Fig. 10B).

Nup270 y Nup153 se procesan a diferentes tiempos en la infección con el FCV

Para confirmar la identidad de las nucleoporinas, se seleccionaron las Nup270, Nup153, Nup98 y Nup62 para su detección con anticuerpos específicos para cada una de ellas. Se realizó un ensayo de western blot utilizando extractos totales de células mock e infectadas con el FCV a una MOI de 5 durante 1, 3, 5 y 7 hpi. La Nup270 se detectó como una banda principal de aproximadamente 270 kDa, además de algunas bandas de menor peso molecular, mientras que la Nup153 se detectó como una única banda de 153 kDa, ambas proteínas tanto en células mock como en las infectadas durante 1 h (Fig. 11A). La alteración en la integridad de ambas nucleoporinas se corroboró durante la infección con el FCV; particularmente la Nup270 se procesó desde las 3 hpi resultando en la detección de una nueva banda de menor peso molecular (250-260 kDa aproximadamente) posiblemente producto de su

procesamiento, y se observó la pérdida progresiva y total de ambas bandas a las 5 y 7 hpi (Fig. 11A).

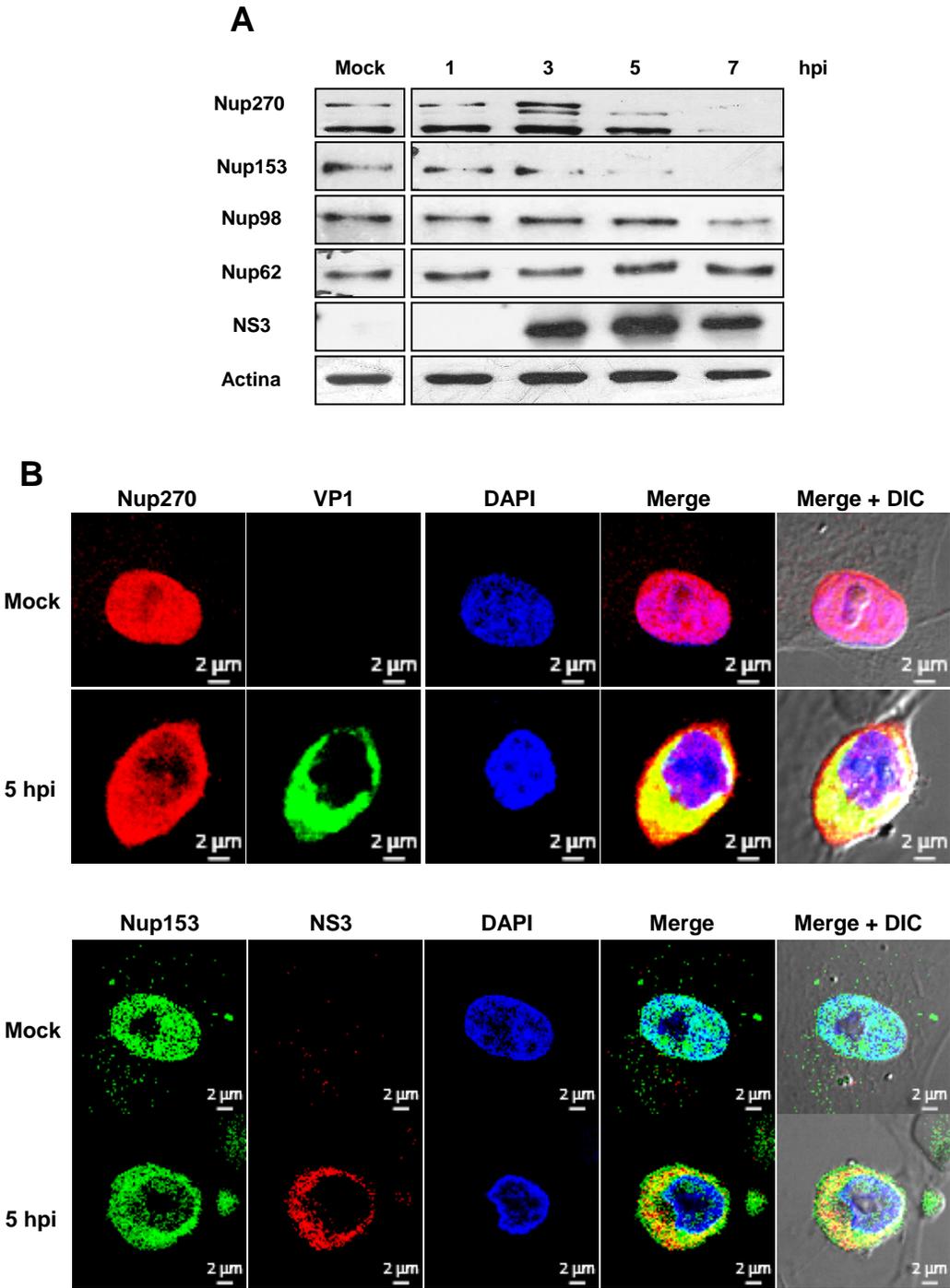


Figura 11. Procesamiento y deslocalización de la Nup270 y Nup153 en la infección con el FCV. (A) Análisis de western blot de células CrFK no infectadas (mock) e infectadas con el FCV (MOI de 5) a los tiempos indicados, se realizó usando los anticuerpos específicos contra la Nup270, Nup153, Nup98 y Nup62, además del anti-NS6/7 y anti-actina como control. (B) Inmunofluorescencia de células CrFK no infectadas (mock) o infectadas con el FCV (MOI de 5) a 5 h. Los paneles de la primera columna izquierda muestran a la Nup270 (panel superior, rojo) y Nup153 (panel inferior, verde), seguidos por los paneles de que muestran a la proteína VP1 (panel superior, verde) y NS3 (panel inferior, rojo), las tres últimas columnas muestran la tinción del núcleo con DAPI, y la mezcla de los anteriores más las imágenes de campo claro (Merge, Merge+DIC). Las imágenes de células individuales fueron capturadas usando el CLSM (ver materiales y métodos).

Sin embargo, la pérdida de la Nup153 se observó a partir de las 5 hpi, siendo más evidente a las 7 hpi (Fig. 11A). El procesamiento inicial de la Nup270 y la pérdida de la Nup153 observadas a las 3 y 5 hpi respectivamente, correlacionaron con la actividad de la proteasa-polimerasa viral NS6/7 representada por la detección de la proteína viral NS3 desde las 3 hpi (Fig. 11A). Por otra parte, la Nup98 y Nup62 permanecieron sin ningún cambio hasta las 7 hpi, sugiriéndonos que estas dos nucleoporinas no se afectaron durante la infección con el FCV (Fig. 11A). Para corroborar estos resultados, la Nup270 y Nup153 se analizaron a después de 5 hpi por microscopía confocal. En las células mock, la Nup270 (rojo) y la Nup153 (verde) fueron observadas predominantemente en el núcleo y de manera discreta en el citoplasma (Fig. 11B). Sin embargo, en las células infectadas por 5 h, se observó una aparente disminución de la Nup270 y Nup153 en el núcleo, pero un incremento significativo en la localización citoplásmica de ambas (Fig. 11B), probablemente como consecuencia de su procesamiento, desensamble del NPC y degradación. Los cambios en la localización de ambas nucleoporinas a las 5 hpi, coincidieron con la presencia de las proteínas virales VP1 (verde) y NS3 (rojo) (Fig. 11), y confirmaron la actividad de la proteasa viral NS6/7. Los anticuerpos para la Nup98 y Nup62 no fueron capaces de detectarlas por inmunofluorescencia. Con estos primeros resultados, demostramos que durante la infección con el FCV ocurre el procesamiento de algunas nucleoporinas del complejo del poro nuclear (NPC), lo que nos sugirió una alteración en el transporte núcleo-citoplasma.

PTB y hnRNP A1 se localizan en el citoplasma de células infectadas con el FCV

Para determinar si el procesamiento de las nucleoporinas durante la infección con el FCV tenía alguna correlación con cambios en la localización de proteínas nucleares, se analizó la localización subcelular de las proteínas PTB y hnRNP A1 por inmunofluorescencia indirecta (Fig. 12).

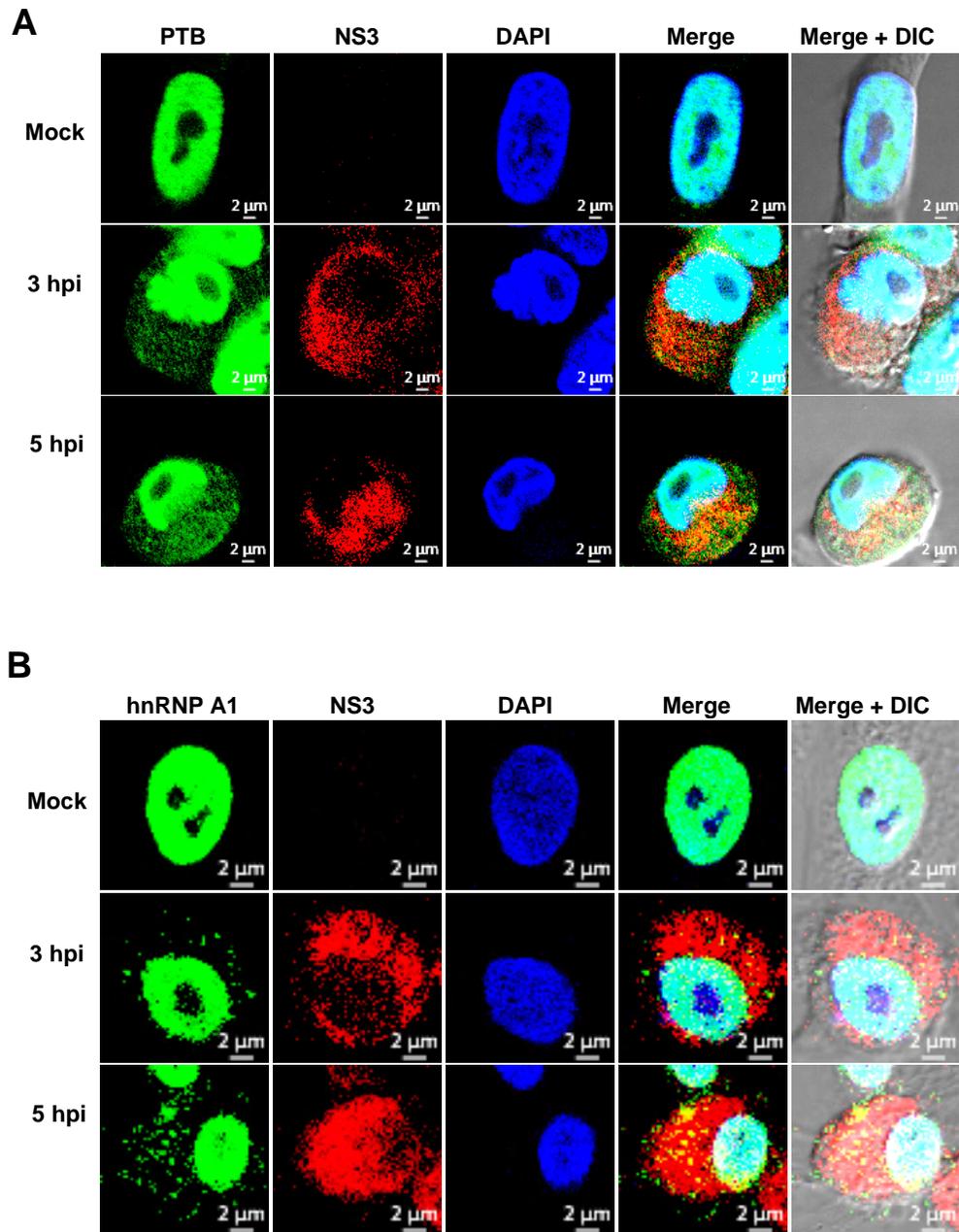


Figura 12. Localización subcelular de PTB y hnRNP A1 en la infección con el FCV. Análisis de inmunofluorescencia de células CrFK no infectadas (mock) e infectadas con el FCV (MOI 5) a 3 y 5 h, teñidas con los anticuerpos contra PTB (verde) (A), hnRNP A1 (verde) (B), y la proteína viral NS3 (rojo) (A,B). Las imágenes de células individuales fueron capturadas usando el CLSM (ver materiales y métodos).

Como era de esperarse, PTB (verde) se detectó en el núcleo de células no infectadas (mock), sin embargo, a partir de 3 hpi además de su localización nuclear, PTB también se observó discretamente en el citoplasma, lo cual fue más evidente a las 5 hpi (Fig. 12A). Un comportamiento muy similar se observó con la localización subcelular de hnRNP A1, esta proteína se detectó en el núcleo de las células mock, pero a 3 hpi se observó distribuida discretamente en el citoplasma de células infectadas, y mayormente a las 5 hpi (Fig. 12B). El anti-FCV NS3 (rojo) se utilizó para mostrar la infección con el FCV (Fig. 12A y 12B). Aunque el nivel de localización en citoplasma pareció ser mayor en PTB que en hnRNP A1, la presencia de la proteína viral NS3 desde las 3 hpi nos sugirió que la localización subcelular de ambas proteínas nucleares estaba siendo afectada por la infección con el FCV.

El procesamiento de las nucleoporinas tales como la Nup270 y Nup153, y la localización anormal de las proteínas nucleares ocurren a los mismos tiempos de infección, sugiriéndonos que el FCV induce el procesamiento de las nucleoporinas y como consecuencia tiene acceso a las proteínas nucleares PTB y hnRNP A1 implicadas en su ciclo replicativo.

Las nucleoporinas son proteolíticamente procesadas durante la infección con el FCV

Las nucleoporinas del complejo del poro nuclear (NPC) y el transporte núcleo-citoplasmático son blancos comunes en las infecciones virales, en éstas, se afectan algunos de los componentes clave de esta maquinaria lo cual ocasionalmente ocurre a través de la acción de las propias proteasas virales, como consecuencia se inhibe la señalización de la respuesta inmune del huésped y se facilita la replicación viral (144). Particularmente durante la infección por PV y HRV, la degradación proteolítica de nucleoporinas como la Nup62, Nup98 y Nup153 ocurre por acción de la proteasa viral 2A (106), y la degradación de la Nup358, Nup214 y Nup153 por la

proteasa viral 3C (102, 104, 105, 135). Sin embargo, en un contexto no infeccioso pero de apoptosis inducida por algún compuesto como staurosporina, etopósido o actinimocina D, la Nup358, Nup270, Nup214 y Nup153 también son blancos de la actividad de las caspasas (136). Debido a que los calicivirus codifican para una proteasa similar a la 3C de PV (NS6/7 en el FCV), y a que las caspasas son activadas como consecuencia de una replicación activa en la apoptosis inducida por la infección, es posible que la degradación de las nucleoporinas tales como la Nup270 y Nup153, se produzca como resultado de la actividad proteolítica de alguna de estas proteasas.

Para determinar cuáles de estas proteasas estaban involucradas en la degradación de las nucleoporinas, primero se utilizó el inhibidor de pan-caspasas Z-VAD-fmk, un componente permeable a las células que se une irreversiblemente al sitio catalítico de las todas caspasas y de esta manera inhibe la apoptosis. Extractos celulares totales de células mock o infectadas con el FCV a una MOI de 5, en presencia o ausencia del Z-VAD-fmk, se recolectaron a los diferentes tiempos post-infección (1, 3, 5 y 7 hpi), y su efecto en la integridad de las nucleoporinas se determinó por un ensayo de western blot utilizando el anticuerpo Mab414 (Fig. 13). En las células infectadas tratadas con el Z-VAD-fmk (500 μ M), se observó un retraso en el procesamiento de las nucleoporinas desde las 3 y hasta las 7 hpi, en comparación con el patrón observado en las células infectadas no tratadas (Fig. 13A). Sin embargo, las bandas que corresponden a los pesos moleculares de la Nup358, Nup270 y Nup153, se pudieron ver procesadas desde las 5 hpi aunque sin ser degradadas por completo. Para corroborar este resultado, los mismos extractos celulares se analizaron utilizando los anticuerpos específicos para la Nup270 y Nup153. En las células infectadas y tratadas con el Z-VAD-fmk, se observó nuevamente el procesamiento inicial de la Nup270 a las 3 hpi, pero no se observó su total degradación a las 5 y 7 hpi como ocurrió en las células infectadas no tratadas (Fig. 13B). Por otro lado, el procesamiento de la Nup153 se inhibió en las células infectadas y tratadas con el Z-VAD-fmk (Fig. 13B). De manera interesante, el procesamiento de la Nup270 a partir de las 5 y 7 hpi en las células tratadas con Z-

VAD-fmk, coincidió con la presencia de la proteína viral NS3 utilizada como un indicador de la actividad de NS6/7 (Fig. 13B).

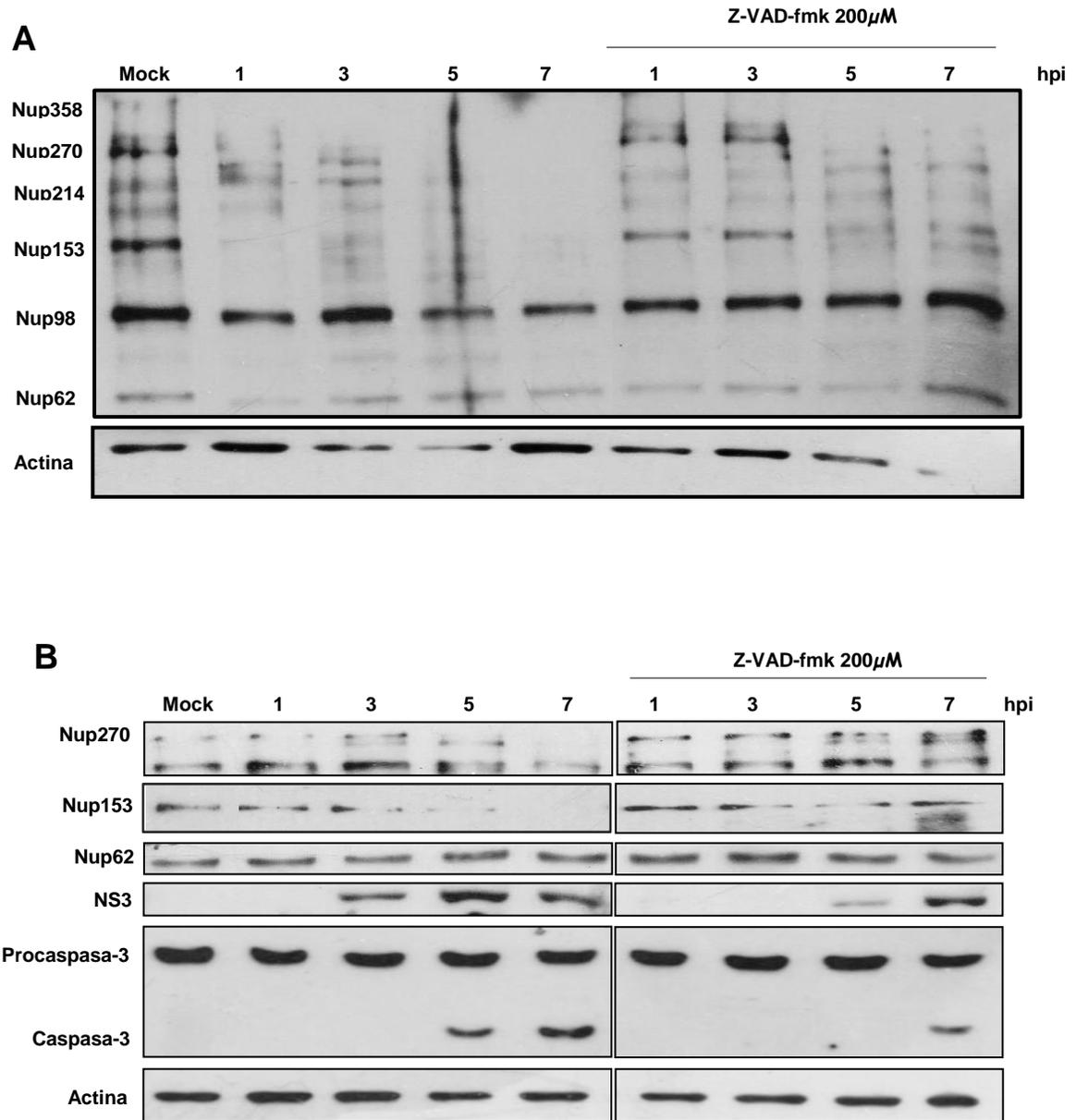


Figura 13. El tratamiento con Z-VAD-fmk inhibe a la caspasa 3, pero afecta a la proteína viral. Análisis de western blot de células infectadas o no (mock) con el FCV (MOI 5) en presencia o ausencia del inhibidor de pancaspasas Z-VAD-fmk utilizando el Mab414 (A) y los anticuerpos específicos para las nucleoporinas individuales Nup270, Nup153 y Nup62, y para la forma procesada y no procesada de caspasa-3 (B). Como control de infección y control de carga se utilizaron anti-NS3 y anti-actina respectivamente (A, B).

Para comprobar el efecto del inhibidor Z-VAD-fmk, se detectó la presencia de la caspasa-3 utilizando un anticuerpo que reconoce el precursor de caspasa-3 (procaspasa-3, 35 kDa) y las formas procesadas o activas de esta caspasa (17 y 19 kDa). En las células infectadas, se identificó la forma activa de la caspasa-3 (17 kDa) a partir de las 5 hpi, mientras que en las células infectadas y tratadas con el Z-VAD-fmk apenas comienza a detectarse a las 7 hpi (Fig. 13B). Con estos resultados pudimos comprobar el efecto inhibitorio de este compuesto, sin embargo, la actividad de la proteasa NS6 observada por el procesamiento de la proteína viral NS3 que se detectó desde las 3 hpi en las células no tratadas, se detectó hasta las 5 hpi en las células infectadas tratadas con el Z-VAD-fmk, lo cual nos sugirió también un efecto del inhibidor Z-VAD-fmk sobre la proteasa viral (Fig. 13B).

El procesamiento inicial de la Nup270 que se identificó en células infectadas a partir de las 3 hpi, correlaciona con la actividad de la proteasa viral y no de la caspasa-3 activa; pero a 5 y 7 hpi cuando el procesamiento de la Nup 270 es más drástico, ambas proteasas están presentes (Fig. 13B). Es por ello que, el efecto inhibitorio del tratamiento con el Z-VAD-fmk sobre la proteína viral, aunque parcial, impidió elucidar el papel de ambas proteasas en el procesamiento de las nucleoporinas.

Nup270 es procesada inicialmente por la proteasa viral, pero su degradación total depende de la caspasa-3

Debido a que el inhibidor Z-VAD-fmk además de inhibir a las caspasas también puede inhibir otras cistein proteasas como las proteasas virales de los picornavirus (145), es posible que también tenga un efecto inhibitorio sobre la proteasa de los calicivirus. Para evitar el probable efecto inhibitorio del Z-VAD-fmk, las células CrFK fueron tratadas durante 4 horas con el Z-VAD-fmk (500 μ M) antes de ser infectadas (pre-tratamiento), con la finalidad de inhibir la activación de las procaspasas pero no de la proteasa viral. Después del tratamiento, las células se infectaron con el FCV a una MOI de 5, los extractos celulares totales se recolectaron a diferentes tiempos de infección (1, 3, 5, 7 y 9 hpi), y la integridad de la Nup270 fue analizada por ensayos de western blot (Fig. 14). En las células infectadas pre-tratadas

con Z-VAD-fmk, la Nup270 se procesó a partir de 3 hpi observándose el producto de procesamiento inicial que había sido previamente identificado en las células infectadas (Fig. 14), sin embargo el posterior procesamiento de la nucleoporina no se observó, ni aun a las 9 hpi (Fig. 14) similar a lo que se observó en la Figura 13B. La forma activa de la caspasa-3 fue detectada únicamente a las 9 hpi en las células infectadas y pre-tratadas en comparación a las no tratadas donde se detectó desde las 5 hpi (Fig. 14), corroborando así el efecto del pre-tratamiento con el inhibidor sobre las caspasas pero no sobre la actividad de la proteasa viral (Fig. 14). De esta manera podemos sugerir que el procesamiento inicial de la Nup270, que ocurre a partir de las 3 hpi, es debido a la acción de la proteasa viral y que en ausencia de caspasa-3 este primer procesamiento se mantiene sin modificaciones posteriores durante toda la infección, sugiriéndonos así la participación de la caspasa-3 en la degradación total de la Nup270.

Para corroborar el papel de la caspasa-3 en el procesamiento de la Nup270 durante la infección por FCV, las células fueron tratadas con Ac-DEVD-CHO, un inhibidor específico de la actividad de caspasas efectoras. El Ac-DEVD-CHO es un ligando de alta afinidad hacia los centros activos de caspasas 3 y 7, dando lugar a la inhibición de su actividad pero sin inhibir el procesamiento de las procaspasas-3 y -7 que dan lugar a sus formas activas, además de que no tiene efecto sobre la actividad de proteasas virales. Siguiendo la misma metodología para la obtención de los extractos totales sin y con el tratamiento del inhibidor Ac-DEVD-CHO durante la infección, se realizó un ensayo de western blot para analizar la integridad de la Nup270 (Fig. 14). El procesamiento inicial de la Nup270 en células infectadas tratadas con Ac-DEVD-CHO (200 μ M) fue semejante al obtenido con el inhibidor de pan-caspasas Z-VAD-fmk, en donde se observó un primer procesamiento de ésta nucleoporina a las 3 hpi. Asimismo, no se observó ningún cambio en el procesamiento de la Nup270 durante el progreso de la infección, a diferencia de lo observado en las células infectadas no tratadas (Fig. 14). Como se esperaba, en el tratamiento con Ac-DEVD-CHO la forma procesada de la caspasa-3 fue detectada desde las 5 hpi, debido a que esta es activada por el procesamiento de la caspasa 9,

sin embargo su inactividad se comprobó con la integridad de PARP, una proteína blanco de la actividad de la caspasa-3 (Fig. 14).

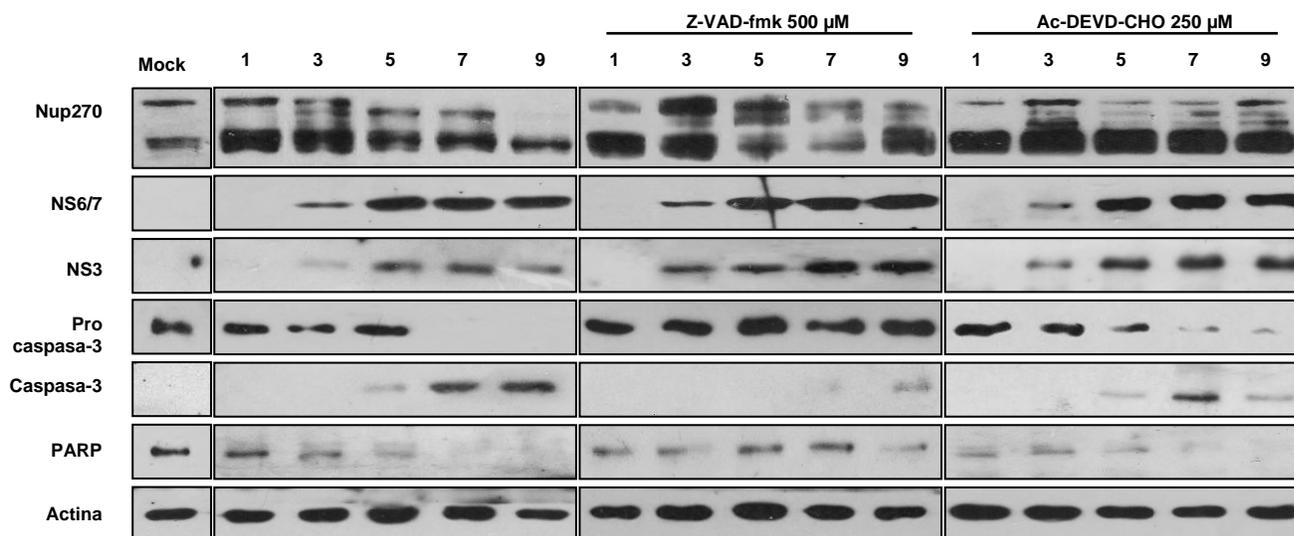


Figura 14. Nup270 es procesada por la proteasa viral y por la caspasa-3. Análisis de western blot de células no infectadas (mock) e infectadas con el FCV a los tiempos indicados, en presencia o ausencia del pre-tratamiento o tratamiento con el inhibidor Z-VAD-fmk y Ac-DEVD-CHO respectivamente, se analizaron utilizando los anticuerpos específicos en contra de la Nup270, NS6/7, caspasa-3, PARP y actina como control de carga.

En la infección con el FCV y el pre-tratamiento o tratamiento de Z-VAD-fmk y Ac-DEVD-CHO respectivamente (Fig. 14), se observó la inhibición del procesamiento de la proteína PARP (180 kDa), en comparación a la infección sin ningún tratamiento en la que se detectó el procesamiento de esta proteína a partir de las 5 hpi (Fig. 14). Además, se demostró que en este tratamiento no hay inhibición en la actividad de la proteasa viral NS6/7, lo cual se pudo comprobar por la presencia de la proteína viral NS3 (Fig. 14). La ausencia de actividad de la caspasa-3 y la presencia de NS6/7 en el tratamiento con Ac-DEVD-CHO, confirman que el procesamiento inicial de la Nup270 observado desde las 3 y hasta las 9 hpi, cuando las actividad de las caspasas esta inhibida, es muy probablemente producido por la NS6/7, mientras que la caspasa-3 está implicada en el procesamiento de Nup270 en los últimos tiempos de la infección por FCV.

Para identificar posibles sitios de corte de la NS6/7 y de la caspasa-3 en la Nup270, se realizó un análisis *in silico* utilizando los servidores PROSPER (para

identificar sitios de corte de diferentes proteasas celulares) y NetPicoRNA 1.0 (para identificar sitios de corte para proteasas de picornavirus), este último debido a la similitud entre la proteasa viral NS6/7 del FCV y la proteasa 3C de los picornavirus (141, 142). Los resultados obtenidos utilizando ambos servidores sugirieron un sitio potencial único de corte para NS6/7 en la región cercana al C-terminal de la secuencia aminoacídica de la Nup270 (Fig. 15A), específicamente en los aminoácidos 2268-2275 (AESEGISS) donde la posición P1 es ocupada por una glutamina (E) y la posición P1' por una glicina (G), que son los aminoácidos reconocidos y cortados de manera preferencial por las proteasas de los calicivirus (146). Este corte genera dos productos de aproximadamente 10 y 260 kDa (Fig. 15B), este último coincidiendo con el producto observado por western blot a partir de las 3 hpi, y el mismo que se observó durante toda la infección en presencia de los inhibidores de caspasas (Fig. 14). Por otra parte, la Nup270 también tiene un sitio único de corte para la caspasa-3 en la posición 1530-1533 (DLQD) (Fig. 15A), este sitio presenta los aminoácidos estrictamente requeridos con un residuo de asparagina (D) en las posiciones P1 y P4, un aminoácido hidrofóbico (L) en P2 y uno hidrofílico (P) en P3 (147). Si este corte por la caspasa-3 ocurre, se generan dos fragmentos de aproximadamente 170 y 100 kDa (Fig. 15B).

Dado que durante la infección con el FCV la proteasa viral NS6/7 es detectada desde las 3hpi y la caspasa-3 a 5 hpi, el análisis *in silico* sugiere que la caspasa-3 además de cortar a la Nup270, también estaría cortando al producto de 260 kDa previamente generado por el corte de la NS6/7, mientras que la NS6/7 podría cortar el producto de 100 kDa generado por la caspasa-3, generando, además de los productos ya mencionados, un producto extra de aproximadamente 90 kDa (Fig. 15B). Con estos hallazgos se apoya la idea de que el corte inicial de la Nup270 que fue observado a 3 hpi, ocurre por la actividad de la NS6/7, seguida por la actividad de la caspasa-3 a partir de las 5 hpi, lo cual provoca la degradación total de la Nup270 que fue más evidente a las 7 y 9 hpi (Fig. 14).

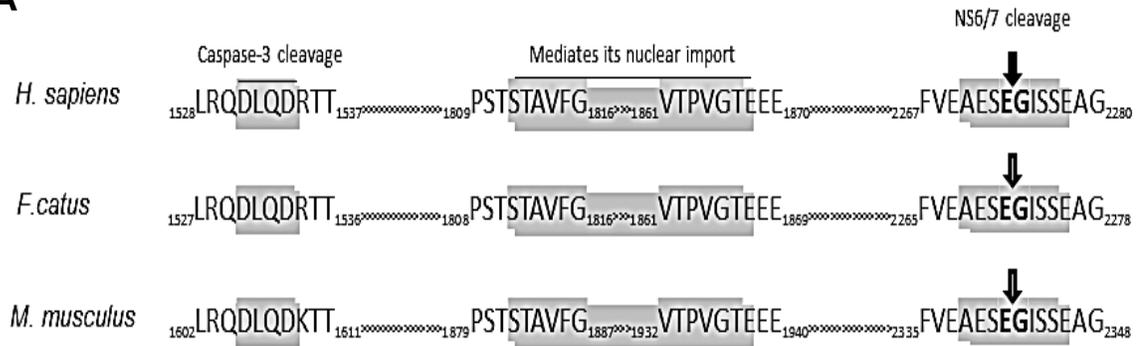
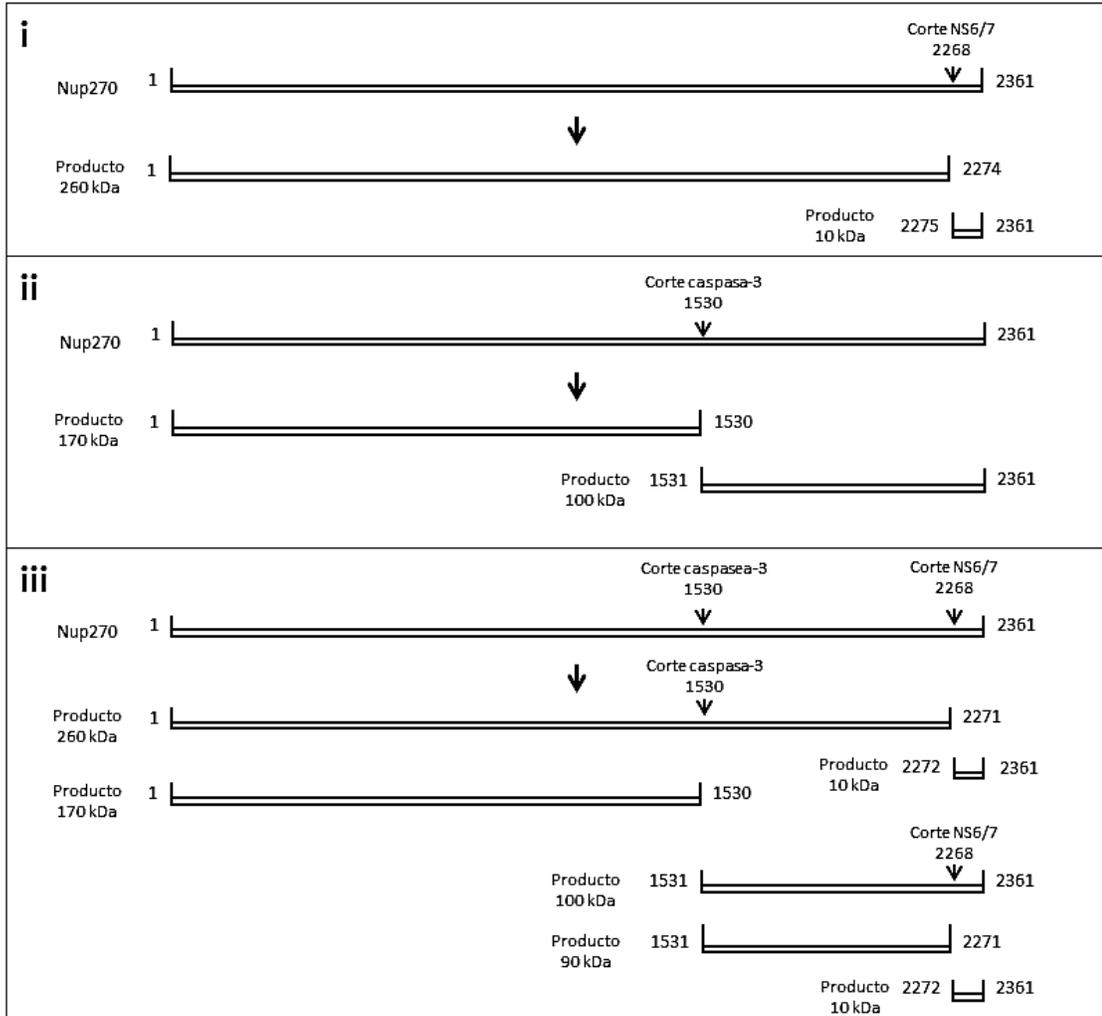
A**B**

Figura 15. Análisis *in silico* de los cortes de la NS6/7 y caspasa-3 sobre la Nup270. (A) Comparación de las secuencias y regiones de interés en el C-terminal de la Nup270 de humano, ratón y gato. (B) Modelo que ilustra los sitios de corte y productos de procesamiento de la Nup270, generados por la proteasa viral NS6/7 (i), caspasa-3 (ii) y ambas a la vez (iii).

Para demostrar de forma clara el procesamiento de la Nup270 por la NS6/7 y caspasa-3, se diseñó un modelo que representa los sitios de corte y los posibles productos de procesamiento de la Nup270 que teóricamente y de manera *in silico* se calcularon (ver la Figura 15B). Tomando en cuenta todos los resultados anteriores, podemos sugerir que la degradación de Nup270 se induce durante la infección por FCV y no es una consecuencia de la activación de caspasas durante la inducción de apoptosis.

El ZnCl₂ inhibe a la proteasa viral NS6/7

Se ha reportado que la NS6/7 de los calicivirus es una cistein proteasa que adopta un plegamiento tipo quimiotripsina y tiene una actividad similar a la proteasa 3C de los picornavirus; así mismo se ha sugerido que la actividad de ambas proteasas virales podría ser bloqueada por inhibidores de tipo cistein, serin, aspartato y metaloproteasas; por otro lado, se sabe que el ZnCl₂ puede fácilmente inhibir la actividad de estas dos proteasas virales (146, 148, 149, 150). Para comprobar el papel de la proteasa del FCV en el procesamiento de la Nup270, las células CrFK fueron infectadas o no (mock) con el FCV a una MOI de 5 en presencia o ausencia de inhibidores de cisteina (E64 y Leupeptin) y serina proteasas (Aprotinin), y los extractos obtenidos a 3 y 5 hpi infección, se analizaron por western blot para observar la integridad de la Nup270 y NS6/7 (Fig. 16A). En las células infectadas y tratadas con E64 (140 μM) o Leupeptin (50 μM), se observó el procesamiento inicial de la Nup270 hasta las 5 hpi, a diferencia de las células infectadas sin tratamiento donde se observó nuevamente a partir de las 3 hpi (Fig. 16A). Por otro lado, en el tratamiento con Aprotinin (1.5 μM), el procesamiento inicial de la Nup270 fue detectado muy pobremente a las 3 hpi pero fue más evidente a las 5 hpi similar al tratamiento con el E64 y Leupeptin (Fig. 16A).

Aunque estos experimentos sugieren que Nup270 es un blanco de procesamiento de la proteasa viral, sería recomendable inhibir totalmente su expresión para poder concluir su papel en el procesamiento de esta nucleoporina. Como otra estrategia para inhibir la actividad de la proteasa viral NS6/7, las células CrFK fueron infectadas o no (mock) con el FCV a una MOI de 5 en presencia o ausencia de ZnCl₂ (25 mM), un potente inhibidor de proteasas virales (146, 149). El ensayo consistió en añadir el ZnCl₂ a diferentes tiempos de la infección (0, 1, 3, 5 y 7 hpi), y colectar los extractos celulares hasta las 9 hpi. La integridad de la Nup270 y la NS6/7 se analizó por western blot (Fig. 16B). Los resultados mostraron que cuando se añadió el tratamiento a las 0 y 1 hpi, no se detectó el procesamiento de la Nup270, lo cual coincidió con la ausencia de la NS6/7 y de la caspasa-3 activa a pesar de que los extractos se recogieron hasta las 9 hpi (Fig. 16B). Sin embargo, cuando el ZnCl₂ se añadió a las 3 hpi, se observó cierta actividad de la NS6/7 que correlacionó con el procesamiento inicial de la Nup270. La presencia de NS3 indicó que la NS6/7 estaba activa antes de la adición de ZnCl₂, y responsable del procesamiento inicial de la Nup270 (Fig. 16B). Aunque la infección se llevó a cabo hasta 9 horas, no se observó ningún procesamiento adicional de la Nup270 lo cual nos sugirió la inactivación de la NS6/7 por el ZnCl₂, además de la consecuente inhibición en el desarrollo de la infección y por lo tanto de la falta de inducción de la apoptosis y como consecuencia de la caspasa-3 (Fig. 16B). Cuando las células fueron tratadas con el ZnCl₂ a las 5 y 7 hpi, y analizadas hasta las 9 hpi, la cantidad de NS6/7 y el procesamiento de la Nup270 fue semejante al de las células infectadas no tratadas a los mismos tiempos de infección (5 y 7 hpi respectivamente) (Fig. 16B). Estos resultados nos confirmaron que el procesamiento inicial de la Nup270 se lleva a cabo por la NS6/7, mientras que el procesamiento adicional por la caspasa-3 ocurre como parte del proceso de apoptosis inducido por la infección.

La inhibición de caspasas no evita la localización citoplásmica de PTB y hnRNP A1 durante la infección con el FCV

Para determinar si la ruptura de las nucleoporinas correlacionaba con la retención de proteínas nucleares en el citoplasma, se analizó por microscopia confocal la localización subcelular de las proteínas nucleares PTB y hnRNP A1 en células infectadas con el FCV a una MOI de 5, en presencia de Z-VAD-fmk o Ac-DEVD-CHO lo cuales, como se mencionó anteriormente, previenen la actividad de las caspasas, pero no de la proteasa viral NS6/7. Los resultados mostraron que, en las células tratadas con cualquiera de los dos inhibidores, una proporción de las proteínas PTB y hnRNP A1 (verde) se retienen en el citoplasma a las 5 hpi, de manera similar a lo observado en células infectadas sin tratamiento, y en contraste con la localización predominantemente nuclear de ambas proteínas en las células mock (Fig. 17A y 17B). Asimismo, los niveles de la proteína viral NS3 (rojo) se detectaron en proporciones semejantes en las células infectadas con y sin tratamiento con ambos inhibidores (Fig. 17A y 17B), corroborando así que la actividad de la proteasa viral NS6/7 no fue afectada, y apoyando la propuesta de que la proteasa viral NS6/7, pero no las caspasas están implicadas en la localización citoplásmica de PTB y hnRNP A1 durante la infección con el FCV.

La localización citoplasmática de PTB y hnRNP A1 durante la infección con el FCV a las 5 hpi, coincide con el tiempo en el que se observa la pérdida de nucleoporinas detectadas con el anticuerpo Mab414 (Fig. 10). Por lo tanto, se analizó por microscopía confocal la integridad de las nucleoporinas en células infectadas con el FCV a una MOI de 5 en presencia de los inhibidores de caspasas Z-VAD-fmk y Ac-DEVD-CHO. A diferencia de lo observado en las células no infectadas, en donde se detecta la integridad de las nucleoporinas como una típica marca perinuclear, a las 5hpi tanto en presencia como en ausencia de los inhibidores, dicha marca se reduce significativamente, indicando su posible degradación en ambas condiciones. Cuando los ensayos se realizaron para la detección de la Nup270, el patrón de distribución de esta nucleoporina en las células no infectadas se detectó como una marca uniforme en el núcleo y ligeramente en citoplasma, a pesar de que este marcaje difirió con el

patrón observado previamente con el Mab414, coincide con algunos otros reportes que señalan la localización predominantemente nuclear de la Nup270 (154).

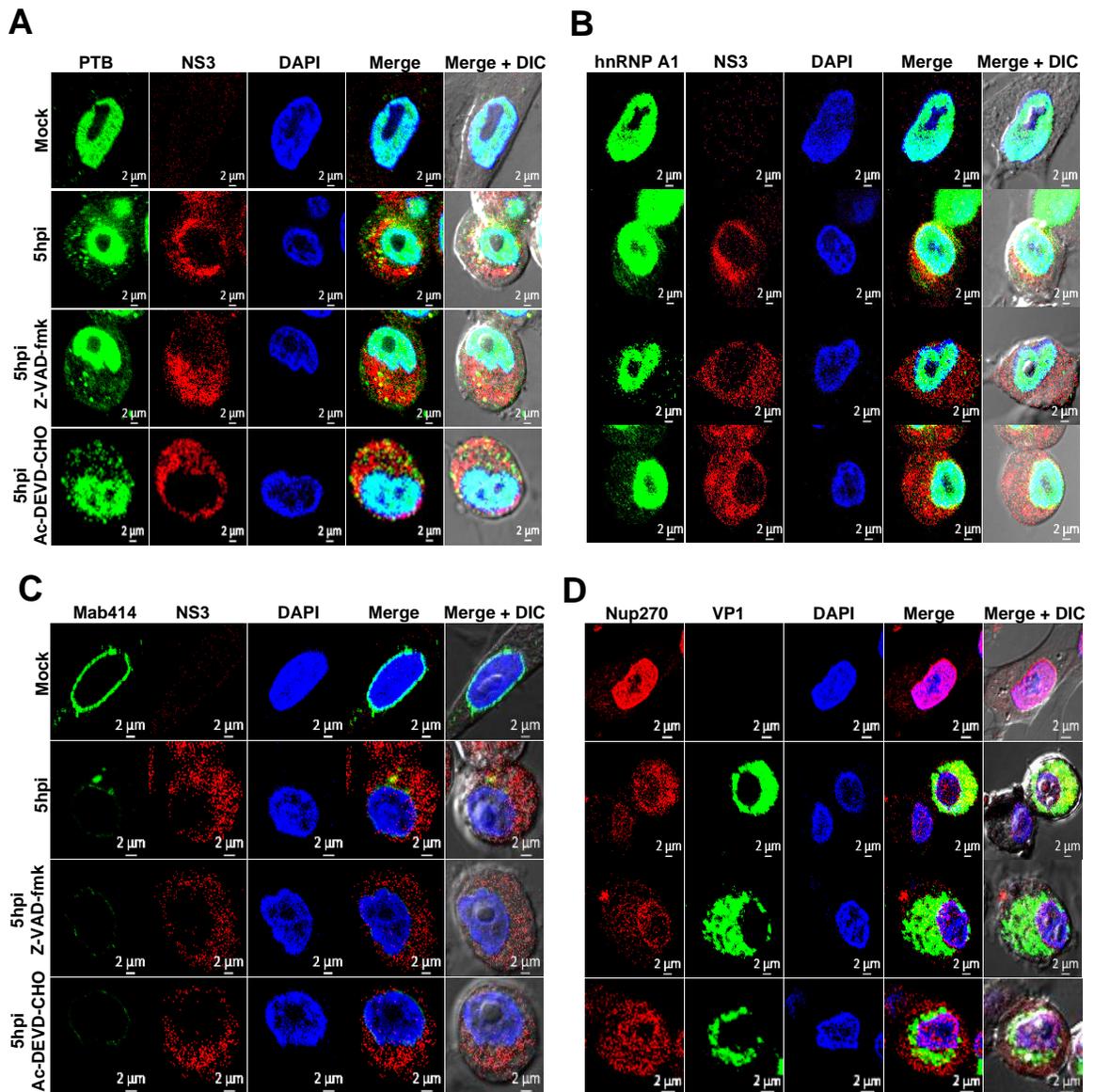


Figura 17. Z-VAD-fmk y Ac-DEVD-CHO no evitan la localización citoplásmica de PTB y hnRNP A1. Células CrFK no infectadas (mock) e infectadas con el FCV (MOI de 5) a 5 h, en presencia o ausencia de los inhibidores de caspasas, y analizadas por microscopía confocal. El patrón de localización se muestra con la tinción de los anticuerpos específicos dirigidos contra PTB (verde), hnRNP A1 (verde), nucleoporinas-FG (verde) y Nup270 (rojo). Células individuales infectadas con el FCV y marcadas con cada uno de los anticuerpos antes mencionados, se muestran en los cuatro paneles (A, B, C y D). La infección por el FCV se muestra con la tinción de las proteínas virales NS3 (rojo) y VP1 (verde), los núcleos teñidos con DAPI (azul) y la mezcla de los diferentes canales, más el campo claro (Merge y Merge + DIC).

Como ya se sabía, la Nup270 (rojo) se observó principalmente localizada en el núcleo y ligeramente distribuida en el citoplasma de las células no infectadas (mock). A las 5 hpi, se observó una reducción de Nup270 en el núcleo y un aumento muy significativo en el citoplasma (Fig. 17D). En presencia de los inhibidores Z-VAD-fmk y Ac-DEVD-CHO, se observó también una reducción de la tinción de Nup270 en el núcleo y un aumento en el citoplasma a 5 hpi (Fig. 17D), sin embargo, estos cambios en la Nup270 en ambas condiciones de inhibición, fueron menos significativos comparados con la infección sin tratamiento, posiblemente debido a que a 5 hpi la Nup270 no se procesa totalmente como en las células infectadas, como se mostró en la Figura 5. El gran incremento en la localización citoplásmica de la Nup270, fue posiblemente como consecuencia de los diferentes fragmentos generados durante la degradación de esta nucleoporina a las 5 hpi, y los cuales coinciden con los productos detectados en los ensayos de western blot (Figura 13).

Tanto la reducción de nucleoporinas detectadas con el Mab414, como los cambios en la distribución subcelular de Nup270, coincidieron con la presencia de las proteínas virales NS3 (rojo) y VP1 (verde) (Fig. 17C y 17D), confirmando la actividad de la proteasa viral en presencia de los inhibidores de caspasas, y reforzando su posible papel en el procesamiento de las nucleoporinas.

El efecto citopático y la salida de partículas virales, no se afecta por la inhibición de las caspasas

Para evaluar las consecuencias de la inhibición de la NS6/7 y de las caspasas en el desarrollo del efecto citopático (CPE) causado por la infección con el FCV, células CrFK no infectadas (mock) e infectadas con el FCV a una MOI de 5, tratadas o no tratadas con los inhibidores Z-VAD-fmk, Ac-DEVD-CHO y ZnCl₂, fueron analizadas por microscopía de campo claro. En las imágenes obtenidas, no se observó inhibición o retraso en el efecto citopático en las células infectadas y tratadas con los inhibidores de caspasas, en comparación a las células infectadas sin tratamiento (Fig. 18A).

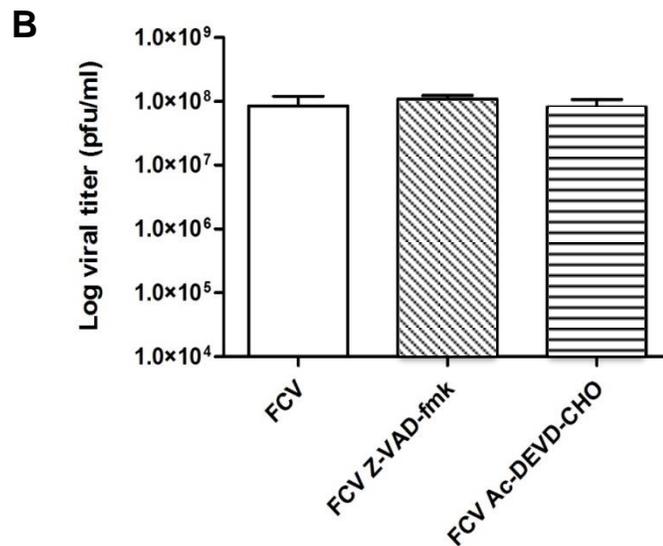
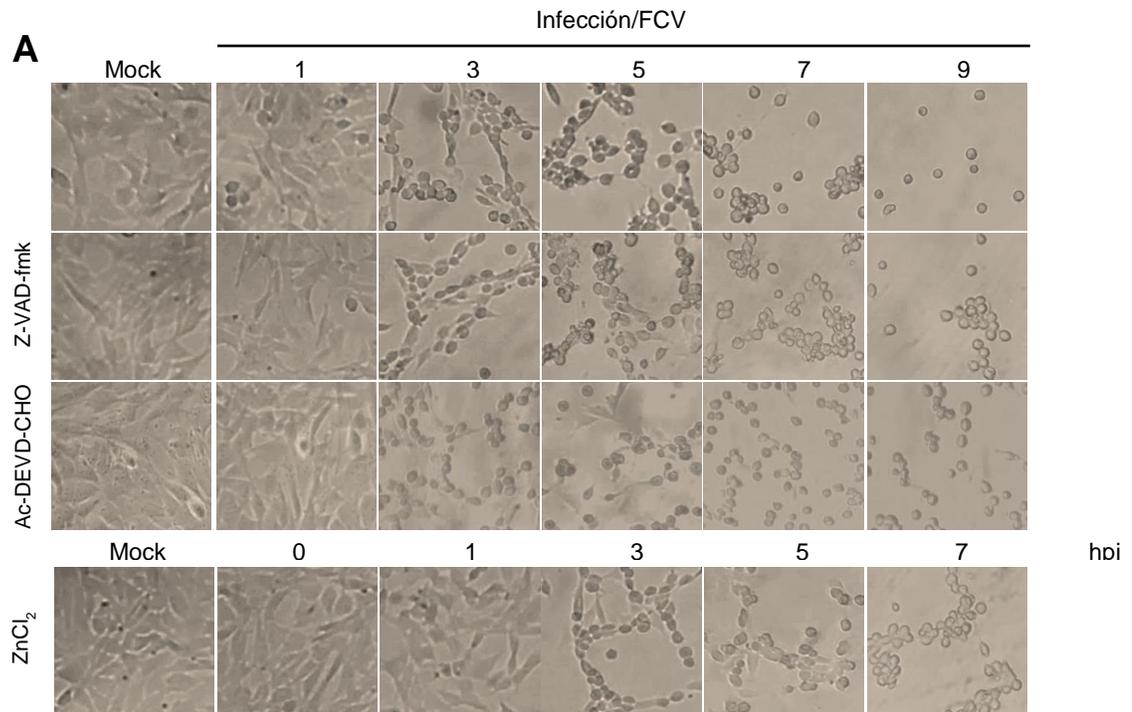


Figura 18. El CPE y la salida de virus no se afectan en la ausencia de caspasas. (A) Monocapas de células CrFK no infectadas (mock) e infectadas con el FCV (MOI de 5), tratadas con el Z-VAD-fmk, Ac-DEVD-CHO o ZnCl₂, fueron monitoreadas, y a los tiempos indicados de infección las imágenes se capturaron utilizando un microscopio de campo claro. (B) Se muestra el gráfico del número de partículas virales obtenidas por 3 ensayos de plaqueo independientes de células CrFK infectadas con el FCV (MOI de 5) en ausencia o presencia del pretratamiento o tratamiento con Z-VAD-fmk y Ac-DEVD-CHO respectivamente,

Sin embargo, si se observó claramente una inhibición y retraso en las células tratadas con $ZnCl_2$ desde las 0 y 1 hpi, aunque cuando el $ZnCl_2$ se añadió a las 3, 5 o 7 hpi, el efecto protector no fue evidente, debido a que a estos tiempos la infección ya ha progresado y por lo tanto hay un desarrollo del CPE (Fig. 18A). Estos resultados nos sugirieron que la inhibición de las caspasas durante la infección por el FCV, no tuvo ningún impacto en el efecto citopático.

Para evaluar el efecto de la inhibición de las caspasas en la producción de partículas virales, se recolectaron los sobrenadantes de las células infectadas a 5h con y sin el tratamiento con los inhibidores de caspasas, y la cantidad de virus presente se cuantificó mediante un ensayo de plaqueo (Fig. 18B). Los títulos virales obtenidos fueron de 8.5×10^7 , 1.1×10^8 y 8.1×10^7 a partir de las células infectadas no tratadas y tratadas con el Z-VAD-fmk o con el Ac-DEVD-CHO respectivamente (Fig. 18B). Estos resultados concuerdan con reportes anteriores que sugieren que el efecto citopático y la liberación de partículas virales además de estar relacionados con la apoptosis, también involucran la actividad de la proteasa viral NS6/7, así como de otras proteínas celulares (Belmokhtar et al., 2001, Broker et al., 2005, Johansson et al., 2003, Leist y Jaattela, 2001, Minarowska et al., 2007, Rintahaka et al., 2011). En nuestras manos, no se pudieron obtener los resultados correspondientes a los ensayos de inmunofluorescencia y plaqueo de las células infectadas tratadas con $ZnCl_2$, esto posiblemente porque el $ZnCl_2$ podría estar afectando a las monocapas celulares ocasionando que no fueran viables para estos ensayos, como ya se ha reportado (Virology blog, 2009).

En resumen, hemos encontrado que las nucleoporinas Nup358, Nup270, Nup214 y Nup153, son procesadas durante la infección con el FCV. El procesamiento de las proteínas se trató de explicar en un modelo que se muestra en la figura 19. El FCV una vez que está dentro de la célula huésped, sintetiza sus proteínas virales entre ellas, a la proteasa viral NS6/7, esta proteasa se auto-procesa y como proteína madura y activa, también procesa a la propia poliproteína para dar lugar al resto de las proteínas virales no estructurales. De manera concomitante, la NS6/7 también se localiza en diferentes regiones subcelulares en donde participa en el

establecimiento de la infección. Particularmente, NS6/7 se localiza en la región perinuclear en donde se encuentran los complejos del poro nuclear (NPCs) y corta a algunas nucleoporinas como la Nup270, trayendo como consecuencia la alteración del transporte núcleo-citoplasma y la consecuente localización citoplásmica de proteínas nucleares como PTB y hnRNP A1. Por otra parte, el procesamiento del resto de las proteínas virales también incluye a la proteína líder de la cápside (LC) del FCV, la cual es escindida del precursor de la proteína VP1, y se ha asociado con el efecto citopático e incluso con la activación de caspasas. Estas caspasas activadas probablemente pueden llegar al NPC y participar en el procesamiento total de la Nup270.

Los resultados anteriores nos permiten sugerir que el procesamiento de las nucleoporinas ocurre como consecuencia de la actividad de la proteína no estructural NS6/7 durante tiempos tempranos de la infección, lo cual pudiera estar relacionado con la inducción de la apoptosis y no es una consecuencia de la misma. Esto concuerda con el hallazgo de que las proteínas no estructurales, son responsables de la activación de la apoptosis durante la infección con el MNV (151). Por otro lado, antecedentes de otros laboratorios han asociado a la proteína LC del FCV como responsable del efecto citopático y la han asociado con la inducción de la apoptosis (30). Es por ello que nos resultó de gran importancia evaluar el papel que desempeñan por si solas las proteínas virales NS6/7 y LC en el procesamiento de las nucleoporinas.

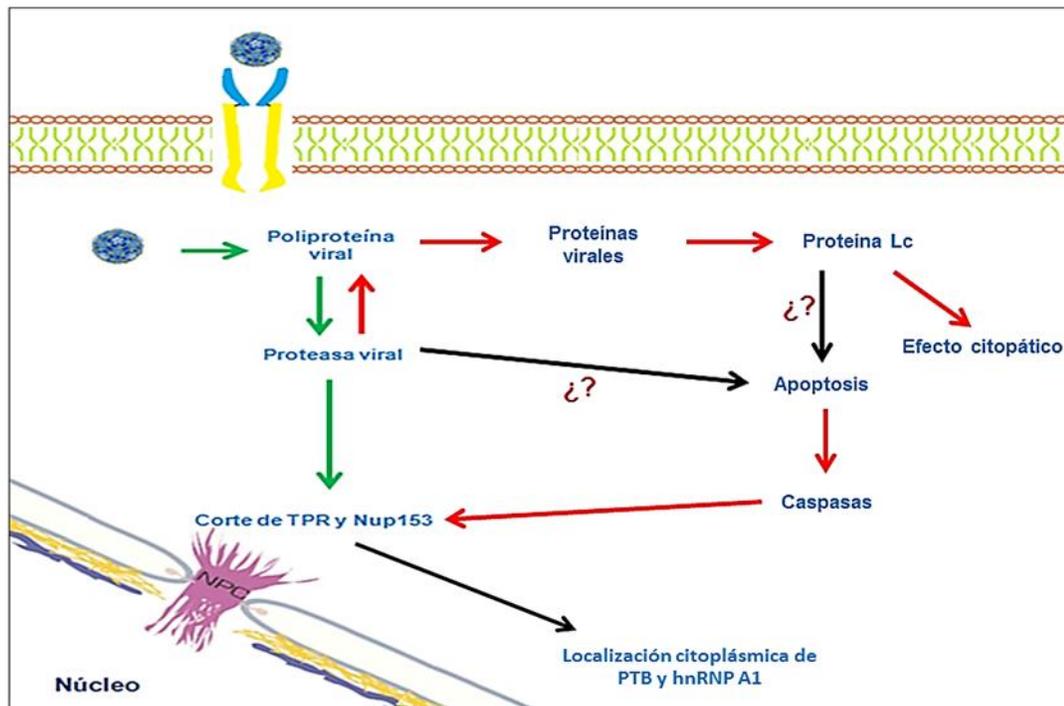


Figura 19. Modelo del procesamiento de la Nup270 y Nup153 en la infección por el FCV. Se muestra una representación esquemática de como ocurre el procesamiento en conjunto de las nucleoporinas por la acción de la NS6/7 y por caspasas durante la infección con el FCV.

Clonación de la proteína viral LC del FCV

Para analizar el papel de la proteína LC en el desarrollo del efecto citopático, activación de caspasas y procesamiento de nucleoporinas, la secuencia del gen de la proteína LC de 372 nucleótidos (124 aminoácidos), se amplificó a partir del RNA de las células CrFK infectadas con el FCV cepa F9 a una MOI 5 durante 5 h mediante RT-PCR, utilizando los dos pares de oligonucleótidos mencionados en la sección de materiales y métodos (Fig. 20A y 20D). El amplicón obtenido, fue purificado utilizando el kit QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN, #28704), y clonado en el vector de tránsito pJET1.2/blunt (Fig. 20B y 20E). El inserto se liberó del vector de tránsito con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI para su clonación en el vector pGEX-5X-1 para expresión en procariontes, y con BamHI y HindIII para la clonación en el pcDNA3.1 (-) para su expresión en eucariotes (Fig. 20C y 20F).

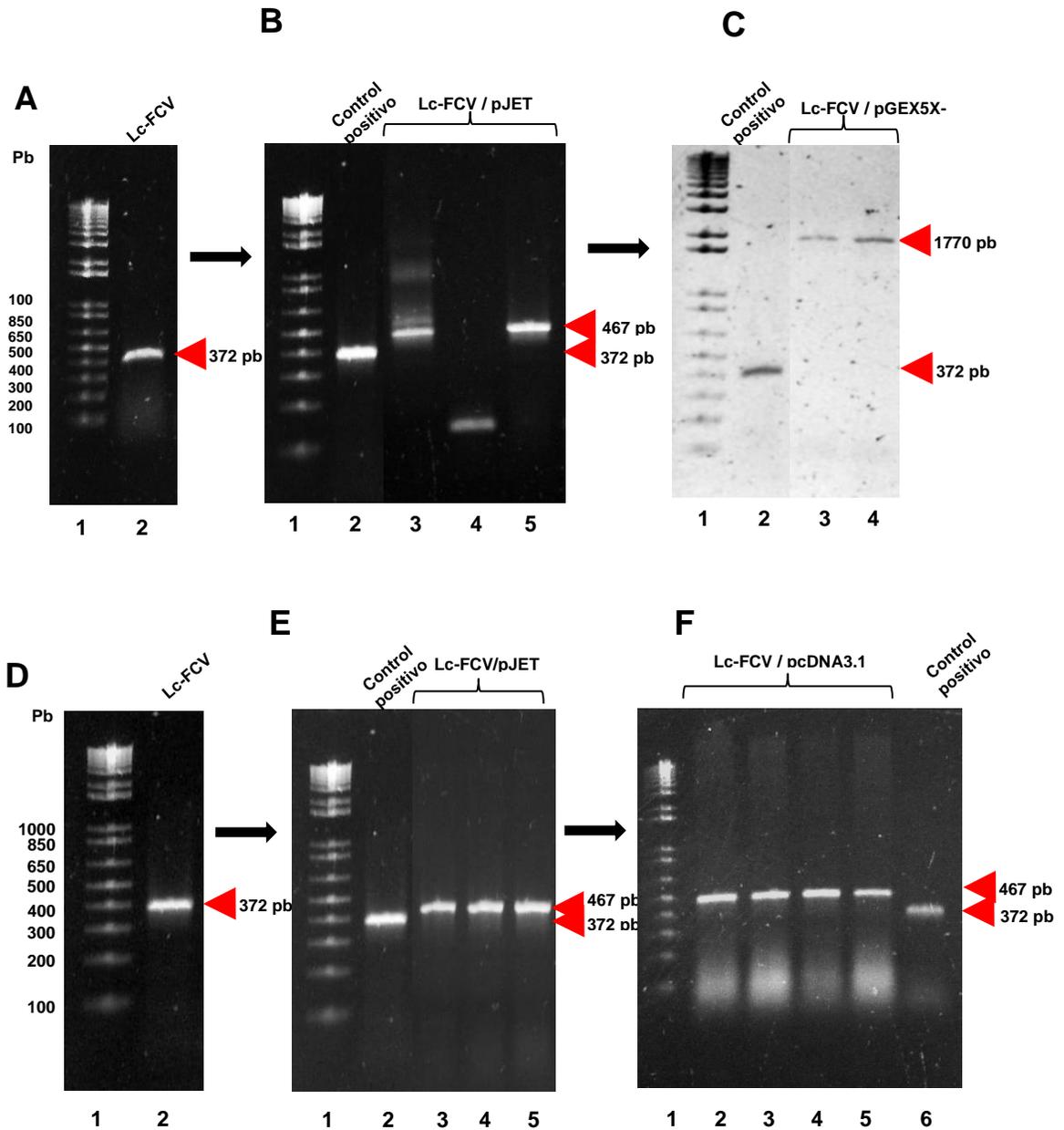


Figura 20. Clonación de LC. Amplificación de la secuencia de la proteína viral LC del FCV a partir del RNA de células infectadas para expresión en procariotas (panel A, carril 2; carril 1 muestra el marcador), y en eucariotas (panel D, carril 2). Amplificación de LC procariota y eucariota en el vector de tránsito, se seleccionaron 3 diferentes clonas (panel B y E, carriles 3-5; carril 1 muestra el marcador, carril 2 muestra el control positivo de LC amplificada a partir del RNA de células infectadas). Amplificación de LC procariota y eucariota del vector pGEX-5X-1 (panel C, carriles 3 y 4) y pcDNA3.1 (-) (panel F, carriles 2-5) respectivamente.

A CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Secuencia      ATGTGCTCAACCTGCGCTAACGTGCTTAAATATTATGATTGGGACCCCATTTCAAATTG 60
FE             ATGTGCTCAACCTGCGCTAACGTGCTTAAATATTATGATTGGGACCCCATTTCAAATTG 60
RE             ATGTGCTCAACCTGCGCTAACGTGCTTAAATATTATGATTGGGACCCCATTTCAAATTG 60
*****

Secuencia      GTAATCAACCCCAACAACCTCCTCTCTGTTGGCTTTTGTAGTAACCCTTAATGTGTTGC 120
FE             GTAATCAACCCCAACAACCTCCTCCTGTTGGCTTTTGTAGTAACCCTTAATGTGTTGC 120
RE             GTAATCAACCCCAACAACCTCCTCCTGTTGGCTTTTGTAGTAACCCTTAATGTGTTGC 120
*****

Secuencia      TACCCAGAACTCCTCCGGAATTTGGA-CTGTTTGGGATTGCGATCGGTCACCACCTTGAA 179
FE             TACCCAGAACTCCTCCGGAATTTGGA-CTGTTTGGGATTGCGATCGGTCACCACCTTGAA 180
RE             TACCCAGAACTCCTCCGGAATTTGGA-CTGTTTGGGATTGCGATCGGTCACCACCTTGAA 180
*****

Secuencia      ATTTACCTAGAATCAATACTTGGTGATGATGAATGGGCATCCACTTTTGACGCTGTTGAC 239
FE             ATTTACCTAGAATCAATACTTGGTGATGATGAATGGGCATCCACTTTTGACGCTGTTGAC 240
RE             ATTTACCTAGAATCAATACTTGGTGATGATGAATGGGCATCCACTTTTGACGCTGTTGAC 240
*****

Secuencia      CCAGTCGTTCCCAATGCCTGCGGTTGCTGCTGGAAAAA-TTTTCCAGCCACACCCCGG 298
FE             CCAGTCGTTCCCAATGCCTGCGGTTGCTGCTGGAAAAAATTTTCCAGCCACACCCCGG 300
RE             CCAGTCGTTCCCAATGCCTGCGGTTGCTGCTGGAAAAAATTTTCCAGCCACACCCCGG 300
*****

Secuencia      TGTTCATGCACCATCTCATTGGTAAGGTTGCTGCAAGTTGGGACCCCGATCTGCCTCT 358
FE             TGTTCATGCACCATCTCATTGGTAAGGTTGCTGCAAGTTGGGACCCCGATCTGCCTCT 360
RE             TGTTCATGCACCATCTCATTGGTAAGGTTGCTGCAAGT-----GCTGCAAG----- 338
*****

Secuencia      AATTCGACTCGAGG 372
FE             AATTCGACTCGAGG 374
RE             -----

```

B CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

Secuencia      ATGTGCTCAACCTG---CGCTAACG-----TGCTTAA-AT--ATT-----AT 36
RP             ATGTGCTCAACCTG---CGCTAACG-----TGCTTAA-AT--ATT-----AT 36
FP             ATGTGCTCACCCAGAAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCAC 60
*****

Secuencia      GATTGGG--ACCCCA-----TTTCAA-ATTGGTAATCAACCC--AACAACTTCTCT 84
RP             GATTGGG--ACCCCA-----TTTCAA-ATTGGTAATCAACCC--AACAACTTCTCT 84
FP             GAGTGGGTTACATCGAACTGGATTCTCAACAGCGGTAA--GATCCTTGAAGATTTTCGC 118
** ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Secuencia      TCTGTTGGC--TTTTGTAGTAAC----CCTTTAATGTGTTGCTA---CCAGAACTCC 133
RP             TCTGTTGGC--TTTTGTAGTAC----CCTTTAATGTGTTGCTA---CCAGAACTCC 133
FP             CCCGAGAAGCCTTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGCGCGGTATTA- 177
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Secuencia      TTCCGGAATTTGGA-CTGTTTGGGATTGCGA-TCGGTCACCACCTTGAAT--TACCTAG 189
RP             TTCCGGAATTTGGA-CTGTTTGGGATTGCGA-TCGGTCACCACCTTGAAT--TACCTAG 190
FP             -TCCG--TGTTGACGCGGGCAAGA--GCAACTCGTCCGCGATACACTATTTCAG 231
**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Secuencia      AATCAATACTTGGTGA-----TGATGAATGGGCATCCACTTTTGACG---CTG 234
RP             AATCAATACTTGGTGA-----TGATGAATGGGCATCCACTTTTGACG---CTG 235
FP             AATGACTTGTGGAGTACCTCAACAGTTCACAGAAAAGCATCTTACGATGGCATGACAG 291
**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Secuencia      TT----GACCCAGTCGTTCCCAATG-CACTGGGGTGTGCTGGAAAAATTTTCCAGC 288
RP             TT----GACCCAGTCGTTCCCAATG-CACTGGGGTGTGCTGGAAAAATTTTCCAGC 289
FP             TTAAGAGAATTATGATGCTTGCAATAACATTGAGATG----TATATAAACTGGCC-GC 346
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Secuencia      CACACCCGGTGTCTCATGCACC-ATCTCATTGG--TAAGGTTGCTGCAGGTTGGGACC 345
RP             CACACCCGGTGTCTCATGCACC-ATCTCATTGG--TAAGG----- 328
FP             CA-ACTTATAC-TTCTGACACACAGAATTCCGAGAACTAAGG----- 386
** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Secuencia      CCGATCTGCCTCTAATTCGACTCGAGG 372
RP             -----
FP             -----

```

Figura 21. Alineamientos de LC. Los resultados de las secuencias de LC clonadas para expresión en eucariotas (A) y procariotas (B), se alinea con la secuencia de LC del FCV cepa F9 (Secuencia) disponible en las bases de datos. FE, RE, FP, y RP corresponden a la secuencia de los primers forward (F) y reversa (R) de eucariota (E) y procariota (P).

Para asegurar la clonación en la posición correcta del inserto de LC en los plásmidos, se utilizaron un par de oligonucleótidos, uno que se pegó al inserto y otro al plásmido. Para la amplificación de ambos insertos de LC en el vector de tránsito, se utilizó el oligonucleótido forward de LC y el reversa que se pega al plásmido pJET1.2/blunt, y se obtuvo un amplicón de aproximadamente 467 pb (372 pb de LC y 95 pb del vector) (Fig. 20A y 20B). Para la amplificación de LC en el vector pGEX-5X-1 se utilizó el forward de LC y el reversa M13 primer y se obtuvo un amplicón 1770 pb (372 pb de LC y 1398 pb del plásmido) (Fig. 20A). La amplificación de LC del pcDNA3.1 (-), se realizó usando el reversa de LC y el primer universal forward T7, y se obtuvo un amplicón de 467 pb (372 pb de LC y 95 pb del vector) (Fig. 20B). El gen de la proteína LC en los plásmidos pGEX-5X-1 y pcDNA3.1 (-), se secuenció para corroborar su identidad en las bases de datos y comprobar que no tuvieran alguna mutación (Fig. 21). En el análisis de las secuencias se identificó un cambio de serina por prolina (TCT por CCT) en la posición 85 en ambas secuencias, lo que nos sugirió un posible cambio de aminoácidos que está presente en la secuencia de LC en la cepa del FCV F9 de nuestro laboratorio (Fig. 21). En la secuencia de LC para expresión en procariotas, identificamos un cambio de asparagina por ácido aspártico (AAC por GAC) en la posición 103 que por la naturaleza de dichos aminoácidos quizá no afecten a la propia secuencia (Fig. 21B). Una vez corroborada la secuencia de ambos plásmidos, estos se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de transfección para su expresión en cultivos celulares de CRFK y para la obtención de la proteína recombinante para su inmunización en ratones y producción de anticuerpos.

Obtención de la proteína recombinante LC en bacterias.

La proteína LC se indujo a partir de la transformación de bacterias BL21 con el plásmido LC-pGEX-5X-1. La proteína recombinante se identificó a partir de 1 h de inducción, la presencia de una proteína de aproximadamente 40 kDa que corresponde al peso esperado para la proteína LC (14 kDa) fusionada a la proteína GST (26 kDa) presente en el propio plásmido. La inducción de esta proteína fue mayor conforme el paso del tiempo (Fig. 22A). Una vez comprobada la inducción de la proteína, se extrajo de la fracción soluble a partir de un cultivo mayor de 3 h de inducción (Fig.

22B). La proteína LC-GST (45 kDa) fue purificada y eluída de la fracción soluble utilizando perlas de glutatión-agarosa (Fig. 22C) y se analizó en un ensayo de western blot utilizando un anticuerpo contra GST para comprobar la identidad de la banda de 40 kDa (LC-GST) (Fig. 22D). La proteína LC-GST purificada se cuantificó y se utilizó para la inmunización de ratones como se mencionó en la sección de materiales y métodos.

La proteína LC provoca un efecto citopático similar al de la infección por el FCV

Para evaluar el papel de la proteína LC del FCV en la activación de caspasas y el procesamiento de la Nup270, el plásmido LC-pcDNA3.1 (-) se transfectó con lipofectamina 2000 en células CrFK. Las células se transfectaron con 5 y 10 µg del plásmido por 48 h y se analizaron por microscopia de campo claro en donde se observó un efecto citopático similar al producido por la infección con el FCV (Fig. 23A), coincidiendo con lo reportado previamente (30).

Las células transfectadas con el plásmido vacío y con el LC-pcDNA3.1 (-), se recolectaron para obtener extractos celulares totales y se analizaron por western blot para determinar la activación de caspasa-3 y la integridad de la Nup270 y se comparó con las células infectadas con el FCV (Fig. 24). El anticuerpo anti-LC previamente producido, detectó una banda de aproximadamente 14 kDa en los extractos correspondientes a 3 y 5 hpi, que no fue detectada en las células mock, con lo que confirmamos el reconocimiento de la proteína LC (14 kDa) (Fig. 24A).

En las células transfectadas con 5, 6, 8 y 10 µg del LC-pcDNA3.1 (-) después de 48 horas post-transfección (hpt), se detectó una banda de 14 kDa (Fig. 24B y 24C), similar a la detectada en las células infectadas; mientras que en las células mock y células transfectadas con el plásmido vacío no se reconoció ninguna banda (Fig. 24B y 24C). Para probar el efecto de la presencia de la proteína LC en la activación de las caspasas, se utilizó el anticuerpo que reconoce a la pro-caspasa 3 y caspasa-3. En las células transfectadas con LC a las concentraciones de 5 y 10 µg, se detectó la pro-caspasa 3 pero no la forma activa de caspasa-3, en comparación a las células infectadas después de 5 h con el FCV donde ambas formas fueron detectadas (Fig.

24B), lo que nos indicaba que la caspasa-3 no fue activada por la presencia de la proteína LC. También se analizó la integridad de la Nup270 en las células transfectadas con 6, 8 y 10 μg de la proteína LC después de 48 hpt (Fig. 24C). No se observó ningún corte o degradación de la Nup270 en las células transfectadas con LC a las diferentes concentraciones (Fig. 24C). La ausencia de la caspasa-3 activa en células transfectadas con LC coincidió con la ausencia de corte en la Nup270, lo que nos sugirió que por lo menos en nuestro sistema, la proteína LC del FCV cepa F9, no induce la activación de caspasas ni el procesamiento de la Nup270, a pesar de que las células transfectadas con esta proteína mostraron un efecto citopático similar al de la propia infección.

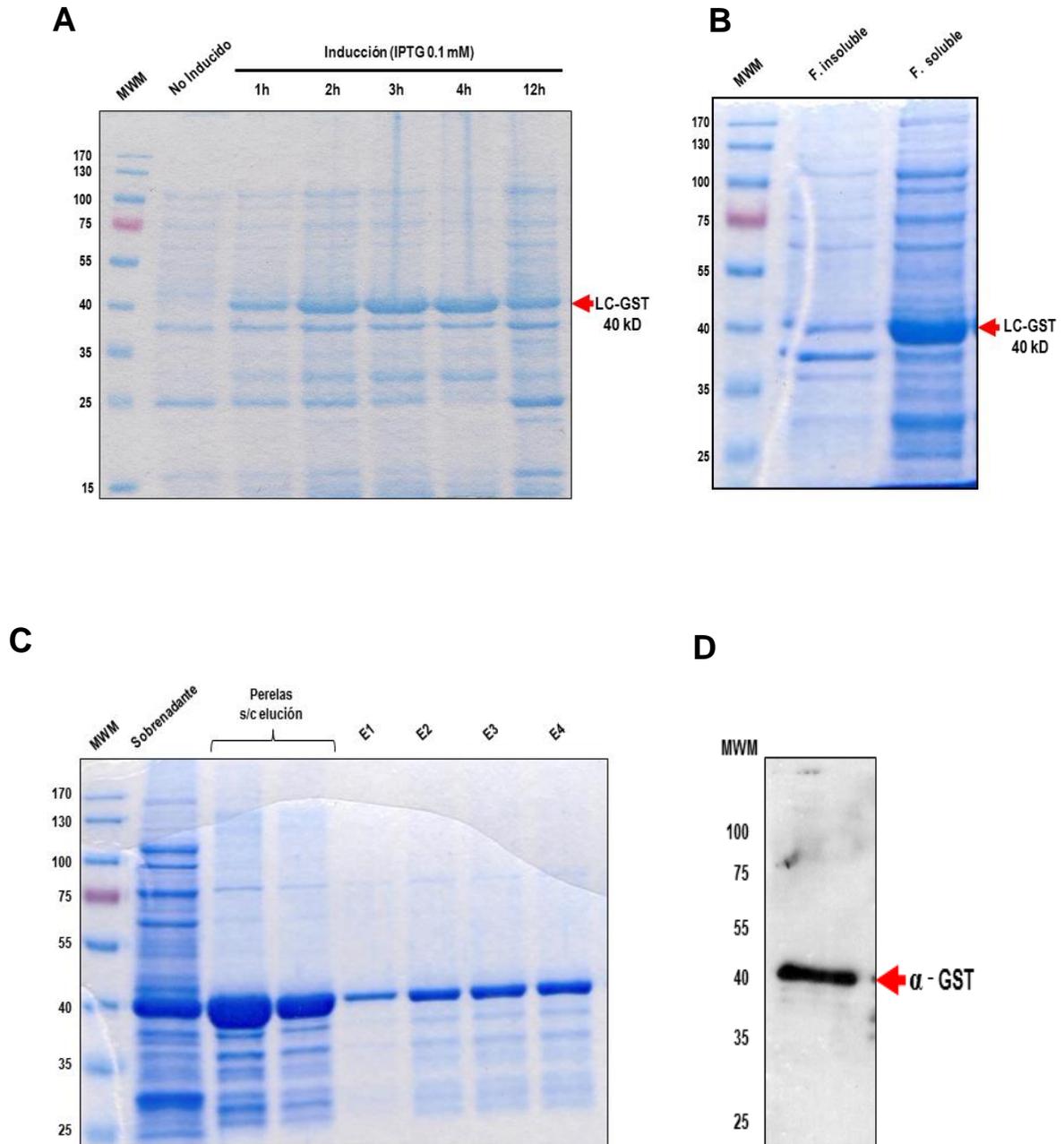


Figura 22. Inducción y purificación de la proteína LC. (A) Inducción de la proteína de fusión LC-GST (45 kDa) a diferentes tiempos. (B) Obtención de LC-GST en fracción soluble de bacterias BL21 inducidas por 3 h. (C) Purificación de LC-GST a partir de la fracción soluble. (D) Western blot de la elución de LC-GST utilizando un anticuerpo contra GST. E1-E4 muestran algunas de las eluciones de la proteína LC-GST.

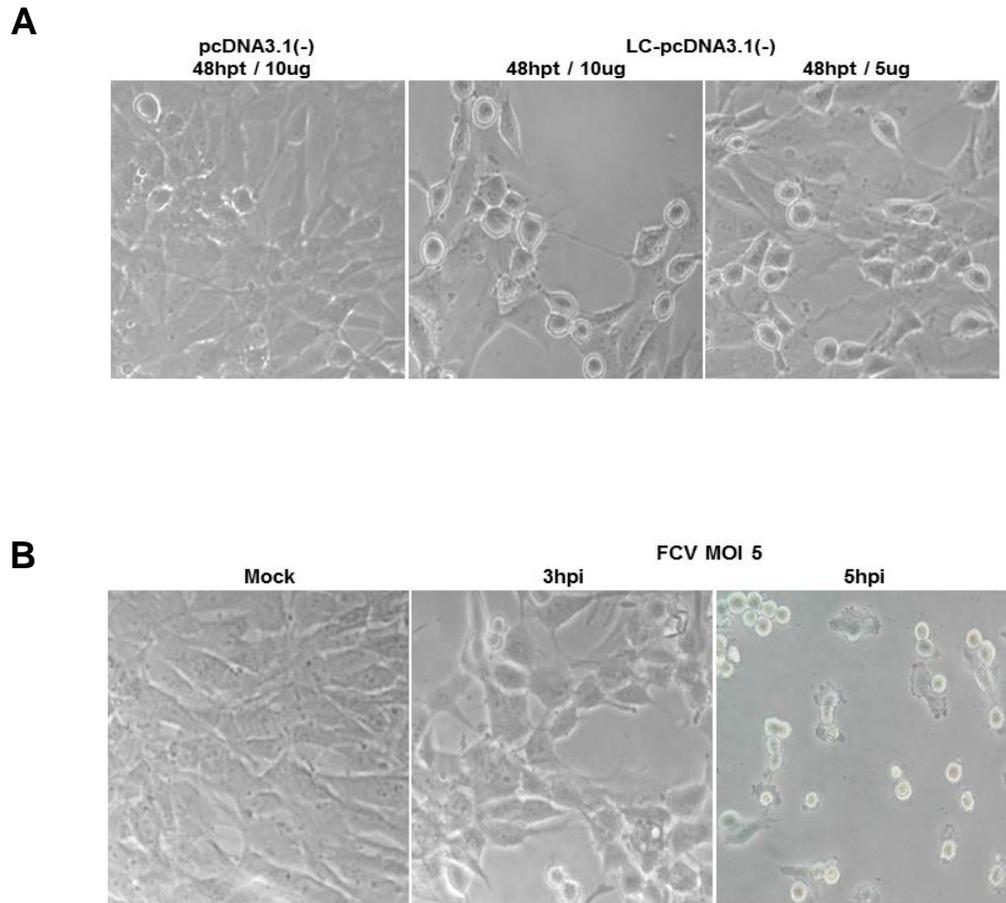


Figura 23. Efecto citopático de células transfectadas con LC. (A) Morfología de células CrFK transfectadas con 10 μ g del plásmido vacío, 5 y 10 μ g de la clonación de LC-pcDNA3.1(-), analizadas después de 48 horas (48 hpt). (B) Morfología de células no infectadas e infectadas a 3 y 5 hpi con el FCV a una MOI de 5.

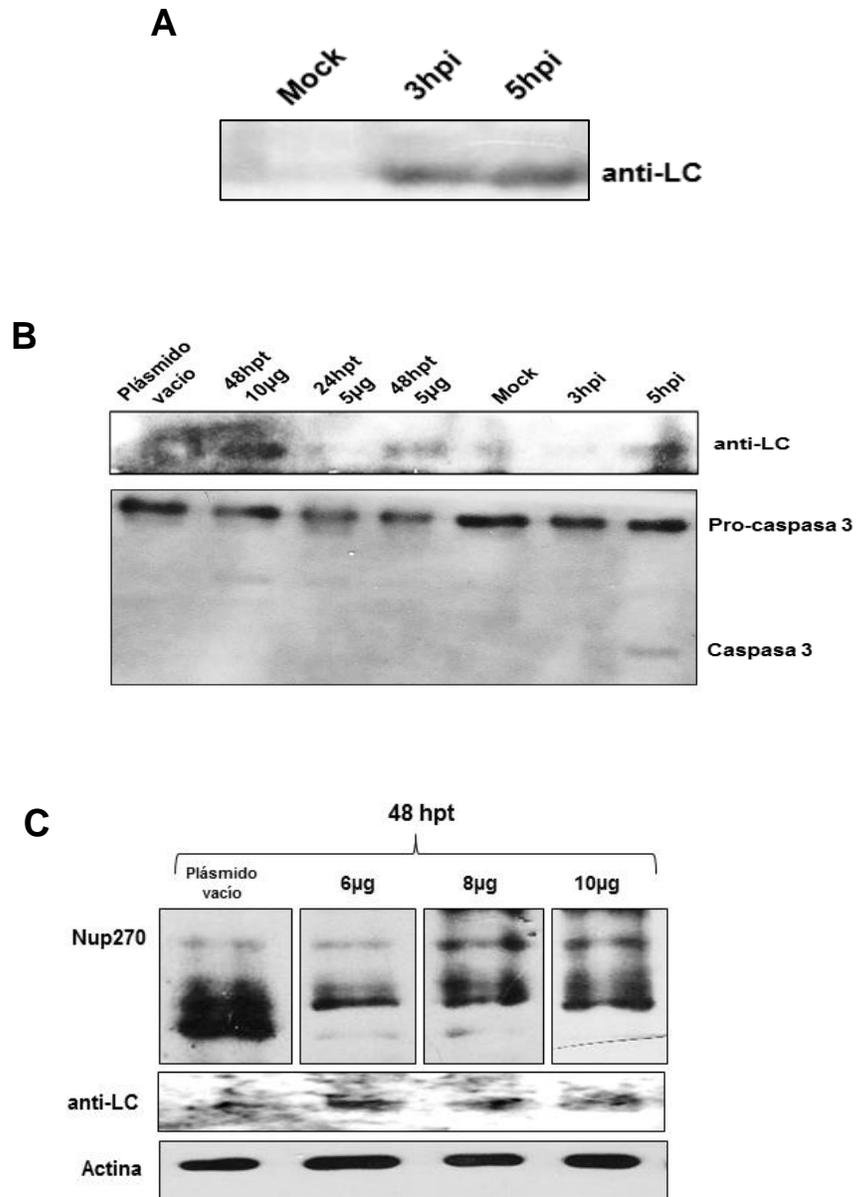


Figura 24. Efecto de la proteína LC sobre la Nup270 y caspasa-3. (A) Western blot de células no infectadas (mock) e infectadas a 3 y 5 h con el FCV, que muestra el reconocimiento de la proteína LC con el anticuerpo previamente producido. (B) Western blot de células CrFK transfectadas con 5 y 10 µg de la proteína LC evaluado a 24 y 48 hpt, que muestra la presencia de LC, pro-caspasa 3 y caspasa-3. (C) Western blot de células transfectadas con 6, 8, y 10 µg de la proteína LC evaluadas a 48 hpt, que muestra la integridad de la Nup270 y la presencia de LC. Todas las transfecciones con el plásmido vacío fueron usando 10 µg del plásmido.

La proteasa NS6/7 del FCV corta a la Nup270

Los resultados anteriores sugieren que la expresión de la proteína LC no tiene un efecto en la inducción del procesamiento de las nucleoporinas. Por otro lado, para determinar la actividad de la proteasa del FCV sobre las nucleoporinas, se utilizaron los plásmidos pmCherryC1-NS6 y pmCherryC1-NS6/7 que contienen las secuencias de la proteasa y proteasa-polimerasa del FCV respectivamente, y donados amablemente por Edward Emmott e Ian Goodfellow (University of Cambridge, UK). Ambos plásmidos y el control, pmCherryC1 (plásmido vacío), se utilizaron en ensayos de transfección en células HEK293T, que han sido ampliamente utilizadas para la transfección con alta eficiencia de DNA plasmídico debido a que contienen el antígeno T del SV40 que incrementa la producción de algunos vectores virales usando métodos de transfección transitoria.

Las células HEK293T se cultivaron sobre cubre objetos tratados previamente con poli-L lisina, y se transflectaron usando 2 µg de los plásmidos pmCherrC1 (plásmido vacío), pmCherryC1-NS6 y pmCherryC1-NS6/7, usando lipofectamina 2000 siguiendo la metodología del fabricante. Las células se analizaron después de 24 horas post-transfección por microscopia de epifluorescencia. A simple vista, no se observó un cambio evidente en la morfología de las células transfectadas con las proteasas en comparación con las del plásmido vacío (Fig. 25). Aunque se observó una muy buena expresión de la proteína mCherry (rojo) en las células transfectadas con el plásmido vacío, en las células transfectadas con los plásmidos que contienen a la proteasa y proteasa-polimerasa (NS6 y NS6/7), el nivel de expresión de la proteína mCherry fue menor (Fig. 25).

Las células HEK293T cultivadas sobre cubre objetos y transfectadas a 16 y 24 horas, se recolectaron siguiendo la misma metodología anteriormente descrita para el ensayo de inmunofluorescencia. Para evaluar la integridad y localización de las nucleoporinas-FG (Mab414), Nup270, PTB y hnRNP A1, los correspondientes anticuerpos se acoplaron a un anticuerpo secundario Alexa 488 (verde).

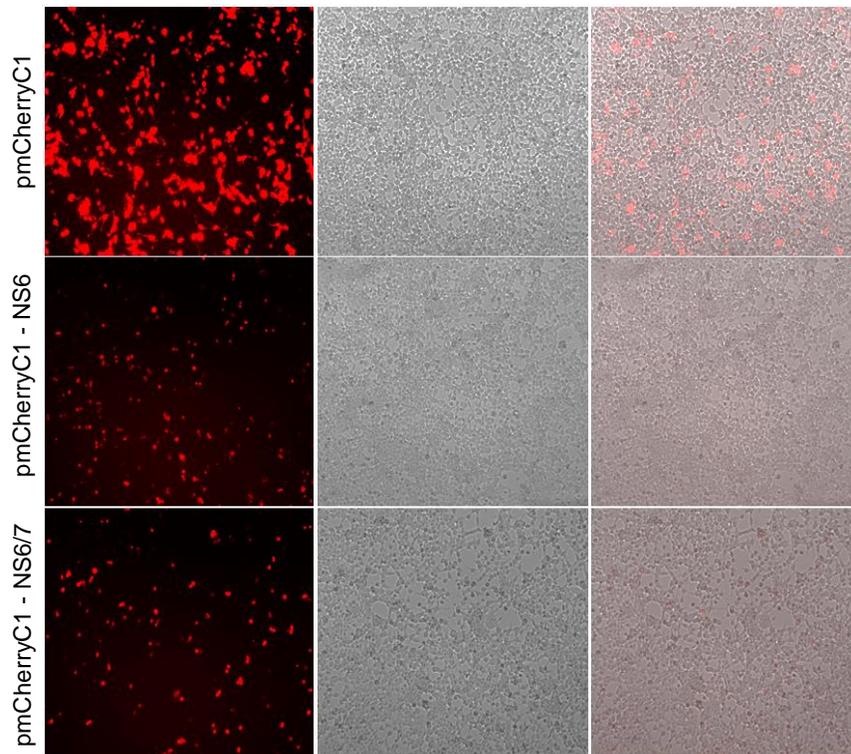


Figura 25. Transfección de la proteasa NS6 o NS6/7 del FCV. Microscopía de epifluorescencia que muestra la expresión de la proteína fluorescente Cherry (rojo) en las células transfectadas con 2 µg del plásmido vacío (pmCherryC1), y de las clonaciones pmCherryC1-NS6 o pmCherryC1-NS6/7, después de 24 horas de transfección.

En las células HEK293T transfectadas con el mCherry C1 (plásmido vacío) por 16 y 24 h, la proteína mCherry (rojo) se observó localizada principalmente en el núcleo; esta localización se observó en todos los ensayos mostrados (Fig. 26 A y B; Fig. 27A y B; Fig. 28 A y B, paneles superiores). Por otro lado, las nucleoporinas-FG, detectadas con el anticuerpo Mab414 (verde), muestran una localización perinuclear que se observa como un anillo alrededor del núcleo, (Fig. 26A y B). En las células transfectadas a las 16 y 24 h con el mCherry C1-NS6 o -NS6/7, ambas proteasas (rojo) se observaron tanto en el núcleo como citoplasma (Fig. 26A y B). Es importante hacer notar que en las células que muestran una menor intensidad de la marca, esta se observa tanto en el núcleo como en el citoplasma, mientras que en las que se observa una mayor intensidad, se localiza predominantemente en el citoplasma (Fig. 26 A y B, paneles central e inferior), de manera semejante a la localización de la

proteasa-polimerasa NS6/7 durante la infección por el FCV (Fig. 10B). En las células transfectadas a las 16 y 24 h con mCherry C1-NS6 o -NS6/7, en donde la distribución de estas proteasas se observa en el citoplasma y núcleo, el patrón perinuclear de las nucleoporinas-FG (verde) se detectó discontinuo, y una proporción de la marca se observa en el citoplasma, sugiriendo que estas proteínas están alteradas (Fig. 26A). Sin embargo, cuando la distribución de la proteasa mCherry-NS6 o -NS6/7 se observó más intensa y únicamente en el citoplasma, el patrón perinuclear de las nucleoporinas-FG se pierde y el marcaje en el citoplasma se incrementa (Fig. 26 A y B), lo que nos sugirió el procesamiento de las nucleoporinas-FG por acción de la NS6/7 del FCV.

Para determinar si el procesamiento de las nucleoporinas-FG por la acción de la NS6/7 del FCV, incluyó a la Nup270, células HEK293T se transfectaron con los plásmidos descritos anteriormente por 16 y 24 h (Fig. 27 A y B). Nuevamente, la proteína mCherry (rojo) se localizó principalmente en el núcleo, lo cual correlacionó con la tinción de Nup270 (verde) en región perinuclear y nucleoplasma (Fig. 27 A y B, panel superior). Sin embargo, en las células que expresaron a mCherry-C1-NS6 o -NS6/7 (rojo) a 16 o 24 hpt, se observó la localización de la proteína en el núcleo y citoplasma, lo cual coincidió con el patrón perinuclear discontinuo de la Nup270 (verde), la pérdida de su marcaje en nucleoplasma, y su dispersión en el citoplasma (Fig. 27 A y B), lo cual corrobora junto con los ensayos de Western Blot (Fig. 14; Fig. 16 B) que la Nup270 es cortada por la proteasa NS6/7 del FCV.

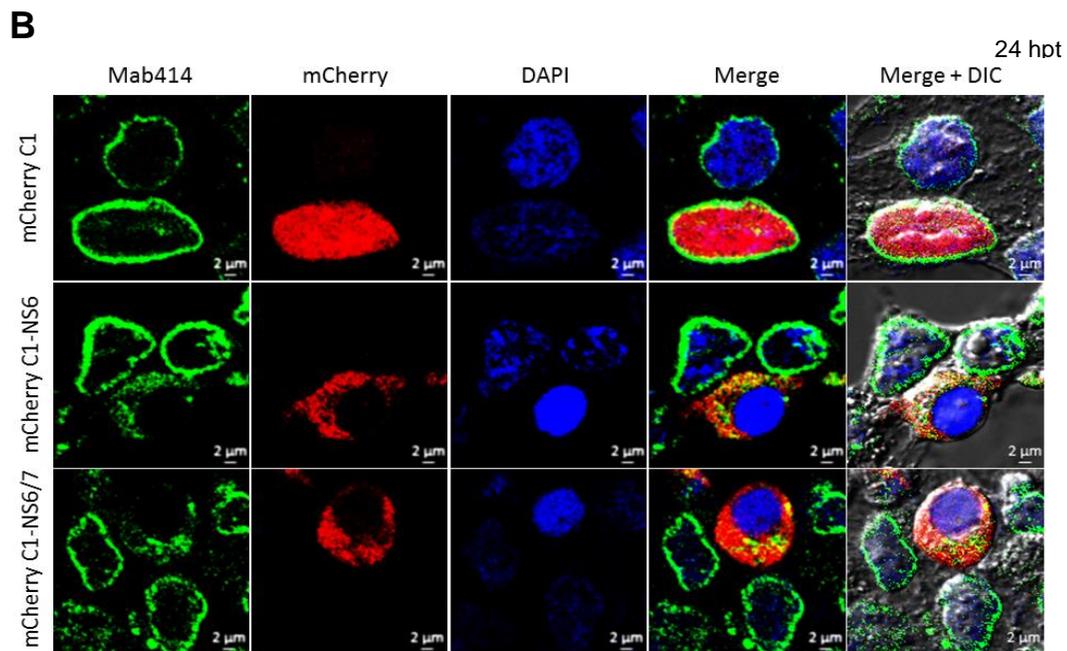
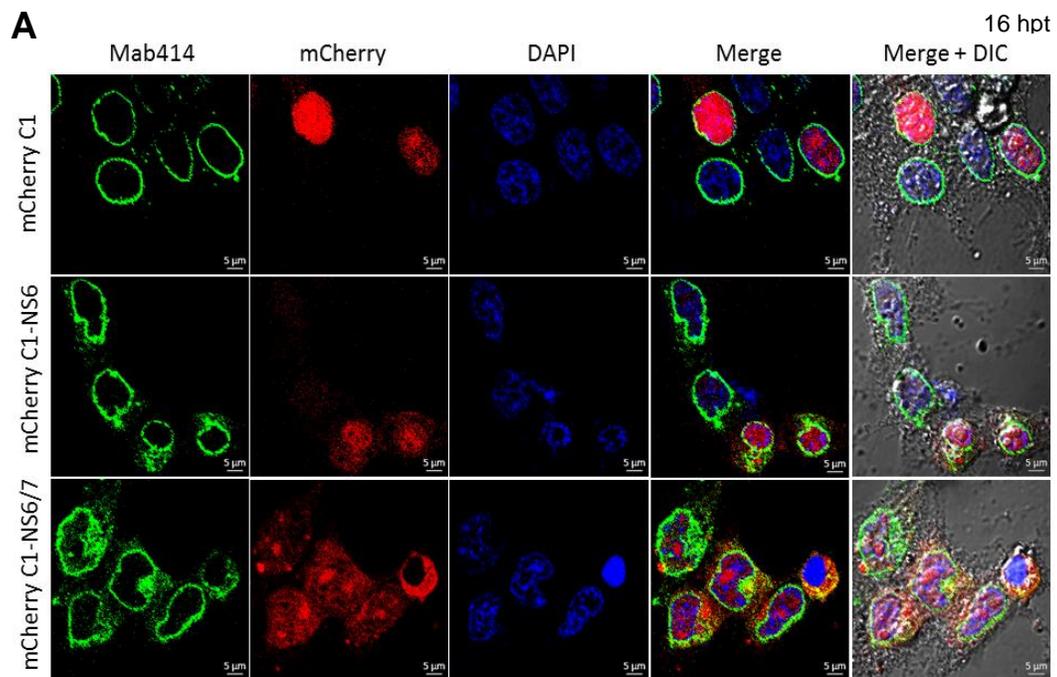


Figura 26. Procesamiento de nucleoporinas-FG por la NS6 y NS6/7 del FCV. Microscopía confocal de células HEK293T transfectadas y analizadas a 16 (panel A) y 24 (panel B) horas post-transfección, con los plásmidos mCherry C1 (filas superior), mCherry C1-NS6 (filas de en medio) y mCherry C1-NS6/7 (filas inferior).

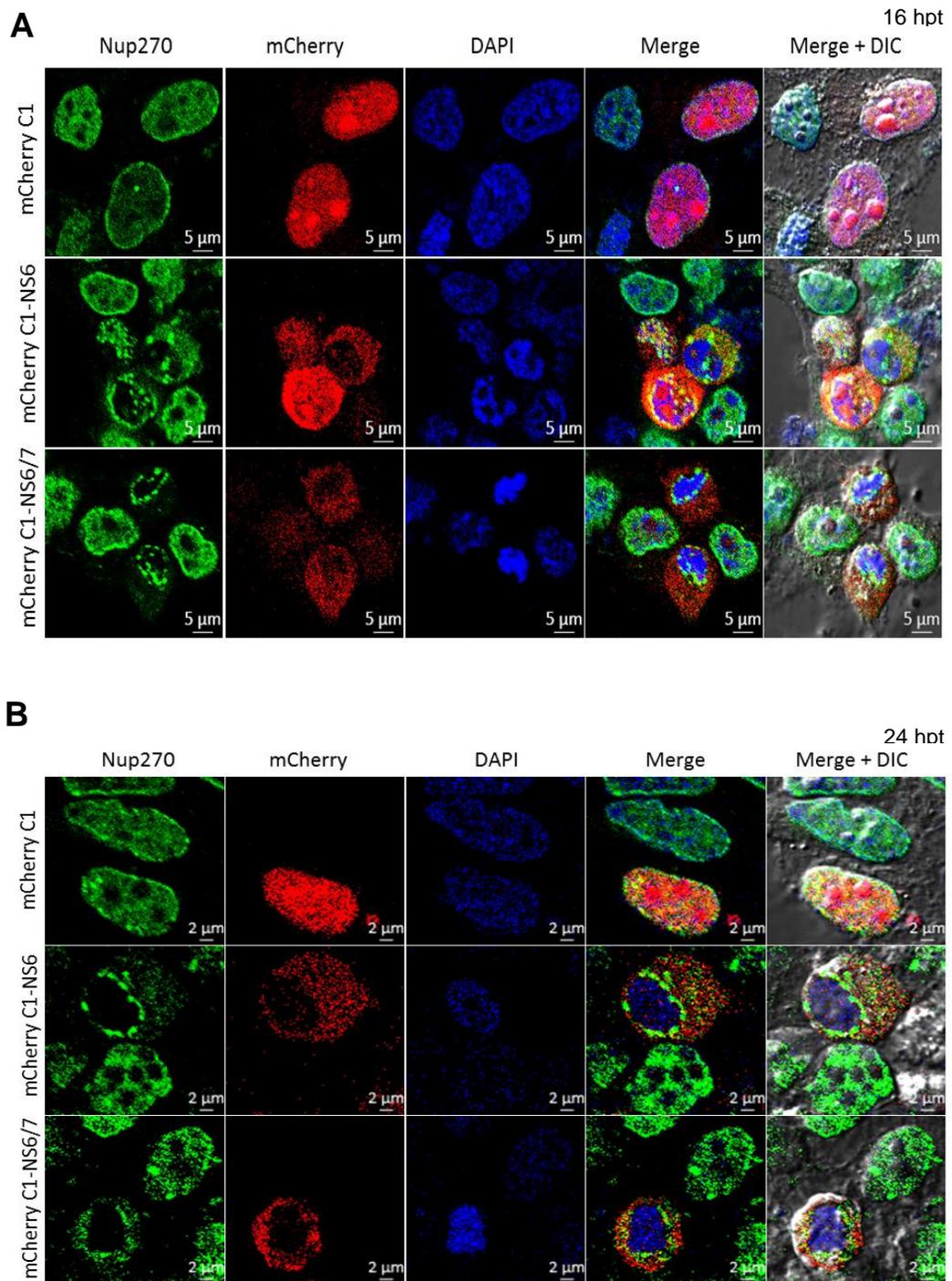
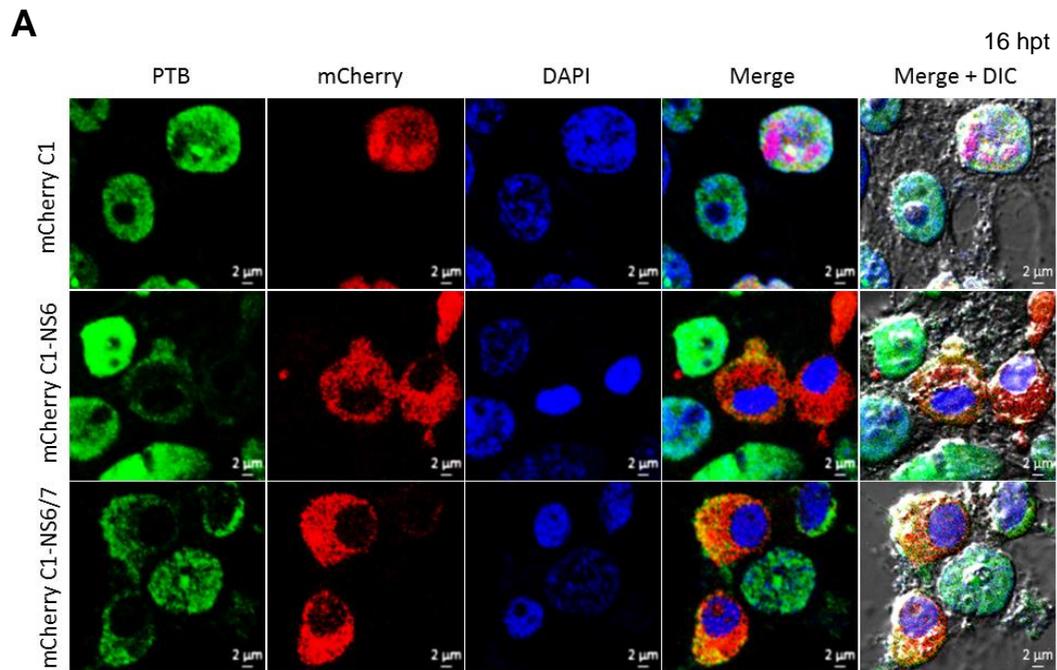


Figura 27. Procesamiento de Nup270 por la NS6 y NS6/7 del FCV. Microscopía confocal de células HEK293T transfectadas y analizadas a 16 (panel A) y 24 (panel B) horas post-transfección, con los plásmidos mCherry C1 (filas superior), mCherry C1-NS6 (filas de en medio) y mCherry C1-NS6/7 (filas inferior).

Para confirmar el posible papel de la NS6/7 del FCV en la localización citoplásmica de las proteínas nucleares PTB, hnRNP A1 y DDX5, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en las células HEK293T transfectadas con el mCherry C1, mCherryC1-NS6 o -NS6/7 por 16 h. En estos ensayos se observó la típica localización nuclear de la proteína mCherry (rojo) y de las proteínas PTB, hnRNP A1 y DDX5 (verde) (Fig. 28 A, B y C). Sin embargo, en las células transfectadas con el mCherry C1-NS6 o -NS6/7, particularmente en aquellas en donde su localización se observa únicamente citoplásmica; se observó la presencia de las proteínas PTB, hnRNP A1 y DDX5 (verde) en el citoplasma celular (Fig. 28 A, B y C), en una proporción mucho mayor a la observada cuando las células son infectadas por el FCV. Estos resultados indican que existe una correlación entre la ruptura de las nucleoporinas y la localización de las proteínas nucleares PTB, hnRNP A1 y DDX5 en el citoplasma.



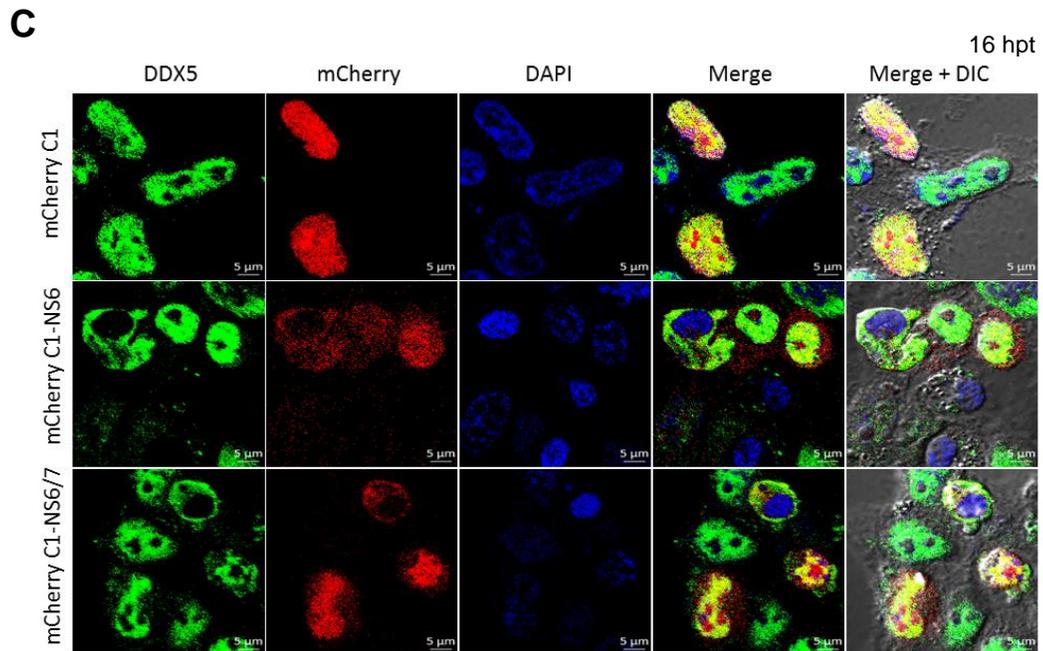
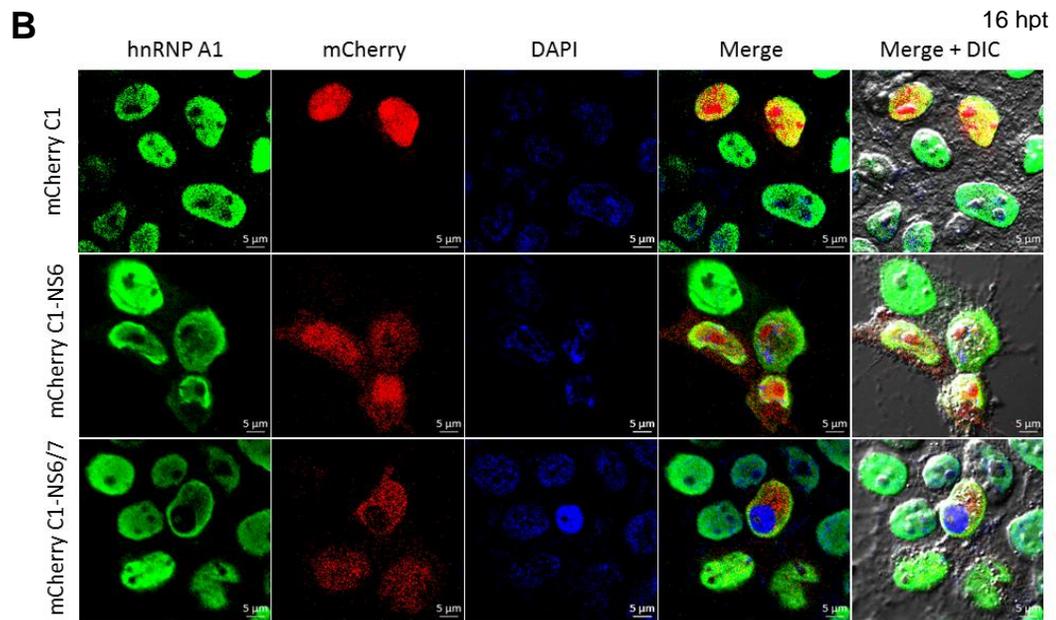


Figura 28. Localización citoplásmica de proteínas nucleares en células que expresan a la NS6 y NS6/7 del FCV. Microscopía confocal de células HEK293T transfectadas y analizadas a 16 horas post-transfección (paneles A, B y C), con los plásmidos mCherry C1 (filas superior), mCherry C1-NS6 (filas de en medio) y mCherry C1-NS6/7 (filas inferior), que muestran la localización subcelular de las proteínas nucleares PTB (panel A), hnRNP A1 (panel B) y DDX5 (panel C).

DISCUSION

La activación de la respuesta inmune y el establecimiento de una respuesta antiviral celular, dependen en gran medida de la señalización a través del complejo del poro nuclear (NPC). Algunos virus han desarrollado estrategias para alterar esta importante vía celular, con lo cual se inhibe el transporte de proteínas celulares responsables de inducir la respuesta inmune innata, y de este modo asegurar la progresión de la infección. La interrupción de este transporte núcleo-citoplásmico podría surgir como consecuencia de la actividad de proteínas virales que interactúan y/o alteran los diferentes componentes de esta maquinaria (139). Por ejemplo, en la infección por enterovirus ocurre la inhibición del transporte mediado por receptores a través del NPC que se produce por el procesamiento proteolítico de un subconjunto de nucleoporinas (105, 134). Estas alteraciones en el NPC traen como consecuencia la localización citoplasmática de proteínas nucleares tales como PTB, La y Sam68 que interactúan con el RNA picornaviral y sus proteínas, aparentemente promoviendo la replicación viral (98, 101). En este trabajo mostramos que la infección por FCV produce el procesamiento de algunas nucleoporinas tales como la Nup358, Nup270, Nup214 y Nup153, pero no de las Nup98 y Nup62. Además, se observó una correlación entre el corte de las nucleoporinas y la localización citoplasmática de las proteínas nucleares PTB y hnRNP A1 a partir de 3 hpi. La implicación del procesamiento de nucleoporinas en la accesibilidad de las proteínas nucleares en el citoplasma para la replicación viral, podría explicar la acumulación de PTB en el citoplasma de las células infectadas con FCV y de PCBP2 y hnRNP A1 en la infección con el MNV; todas ellas implicadas en alguna etapa del ciclo replicativo de estos virus. Alternativamente, la presencia de proteínas nucleares en el citoplasma de células infectadas con FCV podría ser una consecuencia de la condición de estrés generada durante la infección, teniendo en consideración que particularmente PTB y hnRNP A1 pueden acumularse en los gránulos de estrés (SG) generados en estas condiciones (155, 156). A pesar de que la infección por FCV afecta al ensamblaje de los SGs por el corte de la proteína G3BP1 inducido por NS6/7, la vía de respuesta al estrés es activada como se observa por el aumento de la fosforilación del factor de

iniciación eucariota eIF2 α (53), posiblemente permitiendo así la acumulación de mRNAs y proteínas en el citoplasma sin que sean almacenados en estos SGs.

Durante la infección con el FCV, las nucleoporinas con pesos de 358, 270 y 214 son procesadas desde tiempos tempranos, como se detectó por western blot con el anticuerpo Mab414. Particularmente la identificación del procesamiento inicial de Nup270 con un anticuerpo específico a 3 hpi, coincidió con la presencia de actividad de la NS6/7, sugiriéndonos que la proteasa viral estaba siendo responsable de este corte, lo cual se ve reforzando por los análisis *in silico* que mostraron que la proteasa viral NS6/7 corta a la Nup270 en un sitio de su región C-terminal, y genera dos productos de aproximadamente 260 y 10 kDa. Aunque el procesamiento de nucleoporinas también ha sido reportado como consecuencia de la actividad de caspasas, es poco probable que estas sean responsables de este procesamiento inicial, debido a que estas aparecen hasta 5hpi, después de que el procesamiento inicial de la Nup270 ha ocurrido, además debido a que las células tratadas con los inhibidores de pan-caspasas (Z-VAD-fmk) o de caspasa-3 (Ac-DEVD-CHO) no evitaron este primer procesamiento. Sin embargo, en tiempos posteriores de la infección, la Nup270 se procesa más drásticamente y este procesamiento posterior si se evita en presencia de los inhibidores de caspasas. Por lo tanto, parece que las caspasas no participan en el procesamiento temprano de Nup270, sin embargo, si en su procesamiento posterior y total. En el caso del procesamiento de pro-caspasa 3 y la detección de caspasa-3 durante el tratamiento Ac-DEVD-CHO, quizá sea una consecuencia de la actividad de las caspasas iniciadoras que no se inhibe durante este tratamiento, a diferencia del Z-VAD-fmk. Sin embargo, la actividad de la caspasa 3 en estas condiciones todavía esta por determinarse.

La familia *Picornaviridae* es una de las muchas familias de virus que interrumpen el tráfico núcleo-citoplasma de células para promover la replicación viral (97). Durante la infección por estos virus, se produce una degradación severa de nucleoporinas, particularmente de Nup358, Nup214 Nup153, Nup98 y Nup62, lo que resulta en la fuerte alteración del transporte núcleo-citoplasma y la ubicación anormal y masiva de proteínas nucleares en el citoplasma (102, 103, 104, 135,157). Por su

parte, nuestros resultados muestran que Nup358, Nup270, Nup214 y Nup153, pero no Nup98 y Nup62 se procesan durante la infección por el FCV y correlacionan con una discreta acumulación de PTB y hnRNP A1 en el citoplasma de las células infectadas. En la infección por picornavirus, las dos proteasas virales codificadas, son responsables del corte de las nucleoporinas: la proteasa 2A, que es responsable del corte de Nup98, Nup62 y Nup153 (157), y la proteasa 3C, de las Nup358, Nup214 así como la Nup153 (102, 103, 104, 105). La degradación de Nup358, Nup214 y Nup153 observada durante la infección por FCV, coincide con las nucleoporinas degradadas por la acción de la proteasa picornaviral 3C, lo cual podría estar relacionado con la gran homología entre las proteasas NS6 y 3C de calicivirus y picornavirus respectivamente (141, 142). Asimismo, el hecho de que el FCV no tenga una proteasa homóloga a 2A de picornavirus, puede explicar la falta de procesamiento de Nup62 y Nup98 en la infección por FCV. La correlación del procesamiento de Nup270 con la presencia de actividad de NS6/7 del FCV a 3 hpi cuando no hay actividad de caspasas, indica que el procesamiento inicial de Nup270 es llevado a cabo por la proteasa viral. Sin embargo, hasta la fecha no existen reportes sobre el procesamiento de la Nup270 por alguna proteasa viral, por lo que el corte de esta nucleoporina durante la infección por el FCV sería el primer hallazgo que involucra el corte de la Nup270. La Nup270, ha demostrado ser el blanco de acción de proteínas virales en otros sistemas virales, que no involucran su procesamiento. Por ejemplo, durante la infección por el reovirus aviar, la proteína viral p17 funciona como un supresor de Nup270, dando lugar a la activación y acumulación nuclear de p53, p21 y PTEN, y produciendo una inactivación de las vías de señalización P13K/AKT/mTOR y ERK, lo cual resulta benéfico para la replicación del virus (158).

La Nup270 está implicada en el transporte de varias proteínas nucleares, particularmente p53. La ausencia de Nup270 causa la acumulación p53 y p21 en el núcleo y afecta la función de CRM1, también conocida como exportina1, implicada en el transporte de grandes macromoléculas incluyendo RNA y proteínas a través de la membrana nuclear hacia el citoplasma (159, 160). El deterioro de la ruta de transporte nuclear por CRM1 debido a la ausencia de Nup270, también reduce la proliferación

celular e induce profundas alteraciones celulares (161). En respuesta a diversos tipos de estrés celular como las infecciones virales, los niveles de p53 se elevan por encima de los niveles basales y se acumula en el núcleo, donde p53 funciona como un activador transcripcional de una serie de genes, particularmente los que promueven procesos celulares como la apoptosis, autofagia o senescencia. Debido a esto, además de su posible papel en la acumulación de PTB y hnRNP A1 en el citoplasma durante la infección por el FCV, el procesamiento inicial de Nup270 producido por la actividad de la NS6/7, también podría estar implicado en el desencadenamiento de la apoptosis a través de la acumulación y activación de p53 en el núcleo. A este respecto, algunos resultados preliminares realizados en el laboratorio sugieren que p53 si se acumula en el núcleo de células infectadas con el FCV (datos no presentados), y explicaría el hecho del porque primero detectamos el procesamiento inicial de Nup270, y después la activación de caspasa-3 durante la infección por el FCV. Estos hallazgos indican que el procesamiento de las Nups a través de la actividad de NS6/7 podrían ser la causa y no la consecuencia de la aparición de la apoptosis y por lo tanto, este procesamiento podría ser uno de los primeros detonadores de su activación.

La transfección de células HEK293T con la NS6 y NS6/7 del FCV, nos permite confirmar la actividad de esta proteasa sobre las nucleoporinas-FG y particularmente con la Nup270; asimismo se corroboró que como consecuencia de su actividad, existe un cambio en la localización citoplásmica de las proteínas nucleares PTB, hnRNP A1 y DDX5, particularmente cuando la expresión de la NS6 o NS6/7 es predominantemente citoplásmica, similar a como se observa durante la infección por el FCV. Un hallazgo interesante es que a pesar de que no existen antecedentes que indiquen la localización en núcleo de la NS6/7 del FCV, nosotros encontramos diferentes fenotipos que muestran su localización nuclear y/o citoplasmática en las células transfectadas con NS6 y NS6/7, lo cual nos sugiere la posibilidad de la presencia de una señal de importe y exporte nuclear presente en la NS6/7 del FCV, que le permitiría acceder al núcleo y en algún momento salir y localizarse en el citoplasma. Esta posible entrada y salida de la NS6/7 en el núcleo, pareció coincidir con el procesamiento gradual de las nucleoporinas-FG y Nup270, y con la

localización citoplásmica de PTB, hnRNP A1 y DDX5, es decir, cuando la NS6 o NS6/7 se localiza en núcleo y citoplasma, se observó el procesamiento de las nucleoporinas-FG y Nup270 como previamente se describió, pero no se detectó la presencia de PTB, hnRNP A1 o DDX5 en el citoplasma; mientras que, cuando la NS6 o NS6/7 se observó predominantemente en citoplasma, tanto las nucleoporinas-FG y Nup270 así como las proteínas PTB, hnRNP A1 y DDX5, se encontraron dispersas totalmente en citoplasma. Estos hallazgos nos podrían sugerir por lo menos dos diferentes etapas en la alteración del transporte núcleo-citoplásmico por la proteasa NS6/7 del FCV. La primera, en la que ocurre el procesamiento inicial de las nucleoporinas por la NS6/7 que llega hasta núcleo, y en la que dicho procesamiento no es suficiente para provocar la localización citoplásmica de las proteínas nucleares; y la segunda en la que el procesamiento de las nucleoporinas es más drástico y que lleva el desensamble de los poros nucleares, y a la acumulación de proteínas nucleares en citoplasma como una posible consecuencia de la inhibición del transporte núcleo-citoplásmico. Sin embargo, sería necesario realizar otros ensayos para confirmar que nuestras observaciones en células transfectadas también ocurren en las infectadas.

Por otro lado, la localización citoplásmica de PTB, hnRNP A1 y DDX5 en las células que expresan a la NS6 o NS6/7, así como la dispersión en el citoplasma del marcaje de las nucleoporinas-FG y de la Nup270, pareciera ser un fenotipo más drástico en comparación a lo que se observa durante la infección con el FCV. Una posible explicación podría radicar en el tipo de línea celular y por lo tanto en las posibles diferencias en la composición de los complejos del poro nuclear y las diferentes nucleoporinas presentes en cada uno de los tipos celulares. Asimismo, otros componentes del transporte núcleo-citoplasma podrían estar afectados diferencialmente en cada tipo celular; mientras que PTB y DDX5 poseen una NLS bipartita y son transportados por la vía clásica de importe nuclear que involucra a la importina α y β , la hnRNP A1 posee una NLS tipo M9 que le permite ser importada por una vía no clásica que involucra a la transportina 1. Esto nos estaría demostrando que dos diferentes vías de importe nuclear están siendo afectadas por la NS6/7 y que ambas vías son afectadas en diferente magnitud, en los dos tipos celulares. Otra

posibilidad podría ser el contexto en el que se realizó cada ensayo, es decir, mientras que durante la infección la proteasa-polimerasa NS6/7 tiene que llevar a cabo al mismo tiempo su función de proteasa y actuar activamente en el procesamiento de la poliproteína, además de actuar como polimerasa y cumplir con la importante función de la síntesis de los distintos RNAs virales, en el contexto de células transfectadas, NS6 y NS6/7 evidentemente no participan en el procesamiento de la poliproteína y probablemente tampoco en la síntesis de ácidos nucleicos, lo que podría resultar en un efecto mucho más drástico sobre sus proteínas blanco celulares.

Las caspasas activadas durante la apoptosis son responsables del corte selectivo de una serie de proteínas celulares clave implicadas en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la célula. Entre éstas, las proteínas del NPC como la Nup93, Nup96, Nup153, Nup214, Nup270, Nup358 y POM121 son procesadas por caspasas, mientras que otras como la Nup98 y Nup62 no lo son (136). Esto coincide con nuestros resultados sobre el procesamiento de Nup270 por la caspasa-3 a partir de las 5 hpi y lo encontrado por análisis *in silico*, y coincide con la falta de procesamiento de la Nup62 y Nup98 durante la infección.

La apoptosis en la infección por calicivirus se ha asociado con la liberación de la progenie viral. Sin embargo, los resultados obtenidos con los dos inhibidores de caspasas (Z-VAD-fmk y Ac-DEVD-CHO) muestran que el efecto citopático, la síntesis de proteínas virales y la liberación de la progenie viral no fueron afectados en la infección con el FCV. En este contexto, se ha reportado que la muerte celular puede ocurrir de manera programada en ausencia e independiente de la activación de caspasas (162). Por lo que se han propuesto modelos alternativos de muerte celular programada (PCD), incluyendo la autofagia, paraptosis, catástrofe mitótica y la PCD tipo apoptosis. A este respecto, la presencia de inhibidores de caspasas en la infección por MNV en macrófagos, puede proceder a través de una vía distinta de muerte celular rápida tipo necrosis y reducción de la producción viral (163), contrario a lo que presentamos en este trabajo. También se sabe que la apoptosis opera a través de vías tanto dependientes como independientes de caspasas, dependiendo de la maquinaria enzimática de la célula. Esto último se ha ejemplificado en la inducción

de muerte en células L1210/S por el tratamiento con staurosporina, donde ambas vías normalmente coexisten (164). En este contexto de inhibición de caspasas, factores de muerte tales como catepsinas, calpains y otras proteasas, desarrollan una muerte celular independiente de caspasas como consecuencia del defecto general en la activación de estas mismas (162, 164, 165, 166, 167, 168). Por lo tanto, es posible que durante la infección por FCV, los inhibidores de caspasas pudieran desencadenar una muerte celular independiente de caspasas que permita el progreso de la infección. Para analizar esto, ensayos de co-tratamiento con inhibidores de caspasas junto con inhibidores de otras proteasas celulares como catepsinas o calpains durante la infección con el FCV, nos podrían sugerir el tipo de muerte celular que se desencadena en ausencia de caspasas.

En conjunto estos resultados indican que el procesamiento de las nucleoporinas en la infección con FCV, interrumpe el transporte núcleo-citoplásmico lo que resulta en una acumulación discreta de proteínas nucleares que se sabe que participan en la replicación viral. Además, el procesamiento temprano de Nup270 podría estar implicado en el desencadenamiento de la apoptosis mediante la activación de p53.

CONCLUSIONES

- 1) Las nucleoporinas Nup358, Nup270, Nup214 y Nup153, son procesadas durante la infección con el FCV.
- 2) El procesamiento inicial de la Nup270 durante la infección por el FCV ocurre por la acción de la proteasa viral NS6/7, a través de un único sitio de corte en su extremo C-terminal, y posteriormente se degrada por la actividad de la caspasa-3.
- 3) El corte de la Nup270 por la proteasa NS6 y la proteasa-polimerasa NS6/7 se corroboró mediante ensayos de transfección analizados por microscopia confocal.
- 4) El procesamiento de la Nup270 coincide con la localización en el citoplasma de las proteínas nucleares PTB y hnRNP A1 tanto en células infectadas con el FCV como transfectadas con la proteasa NS6 y la proteasa polimerasa NS6/7.
- 5) En la infección con FCV, la inhibición de la actividad de caspasas no interfiere con el procesamiento inicial de la Nup270 y tampoco afecta la localización citoplásmica de PTB o hnRNP A1, el efecto citopático causado por la infección, o la salida de virus de la célula.
- 6) En ausencia de caspasas durante la infección, la NS6/7 activa es responsable del corte de la Nup270, y está involucrada de la localización en el citoplasma de PTB y hnRNP A1, el efecto citopático y la salida de virus.

PERSPECTIVAS

- 1) Debido a la función de la Nup270 en el control del exporte y degradación de p53 y su papel de esta en las decisiones de sobrevivencia o muerte celular, se podría analizar la posibilidad del procesamiento de la Nup270 como un mecanismo que utiliza el FCV para inducir la apoptosis.
- 2) Determinar el papel que juega el procesamiento de otras nucleoporinas como la Nup358 y Nup214, en la alteración del transporte de proteínas hacia el núcleo y viceversa.
- 3) Analizar si otras proteínas nucleares también se localizan en citoplasma durante la infección con el FCV lo que llevaría a pensar en la inhibición por completo del importe nuclear o solo es un evento específico que involucra a PTB y hnRNP A1.
- 4) Analizar la localización de mRNAs celulares durante la infección con el FCV, su correlación con el procesamiento de nucleoporinas y la alteración en el exporte nuclear, como un mecanismo que el FCV utiliza para inhibir el exporte nuclear de mRNAs y la síntesis de proteínas celulares.

Referencias

1. National Institutes of Health, NIH, Instituto Nacional de la Diabetes y las Enfermedades Digestivas y Renales, Biblioteca Nacional de Medicina de los EE. UU., 2016.
2. Centers for Disease Control and Prevention, CDC, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Division of Viral Diseases, Norovirus, 2016
3. Centers for Disease Control and Prevention, CDC, 2015.
4. Green K. Y., T. Ando, M. S. Balayan, T. Berke, I. N. Clarke, M. K. Estes, D. O. Matson, S. Nakata, J. D. Neill, M. J. Studdert, and H-J. Thiel. (2000). Taxonomy of the Caliciviruses. *J. Infect. Dis.* Vol. 181 (Suppl. 2): S322-S330.
5. Clarke IN, Estes MK, Green KY, Hansman GS, Knowles NJ, Koopmans MK, Matson DO, Meyers G, Neill JD, Radford A, Smith AW, Studdert MJ, Thiel H-J, Vinje J (2012) Caliciviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (ed) *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier, London, pp 977–986.
6. Farkas T, Sestak K, Wei C, Jiang X (2008) Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol* 82:5408–5416.
7. L'Homme Y, Sansregret R, Plante-Fortier E, Lamontagne AM, Ouardani M, Lacroix G, Simard C (2009) Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes* 39:66–75.
8. Ng TFF, Marine R, Wang C, Simmonds P, Kapusinszky B, Bodhidatta L, Oderinde BS, Wommack KE, Delwart E (2012) High variety of known and new RNA and DNA viruses of diverse origins in untreated sewage. *J Virol* 86:12161–12175.
9. Wolf S, Reetz J, Hoffmann K, Gru'ndel A, Schwarz BA, Ha'nel I, Otto PH (2012) Discovery and genetic characterization of novel caliciviruses in German and Dutch poultry. *Arch Virol* 157:1499–1507.
10. Wolf S, Reetz J, Otto P (2011) Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. *Arch Virol* 156:1143–1150.
11. Qinfeng Liao, Xiaoyan Wang, Dan Wang, Dabing Zhang (2014) Complete genome sequence of a novel calicivirus from a goose. *Arch Virol* DOI 10.1007/s00705-014-2083-6.

12. Desselberger U, Goodfellow I. (2014). Noroviruses: a global cause of acute gastroenteritis. *Lancet Infect Dis* 14:664–665. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70776-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70776-5).
13. Ohlinger, V.F., Haas, B., Meyers, G., Weiland, F., Thield, H.J. (1990). Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J. Virol.* 64, 3331 – 3336.
14. Gaskell, R.M., (1985). *Viral-induced upper respiratory tract diseases*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 257 – 270.
15. Saif, L.J., Bohl, E.H., Theil, K.W., Cross, R.F., House J.A. (1980). Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J. Clin. Microbiol.* 12, 105-111.
16. Khan RR, Lawson AD, Minnich LL, Martin K, Nasir A, Emmett MK, Welch CA, Udall JN, Jr. 2009. Gastrointestinal norovirus infection associated with exacerbation of inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 48:328 –333. <http://dx.doi.org/10.1097/MPG0b013e31818255cc>.
17. Stuart RL, Tan K, Mahar JE, Kirkwood CD, Andrew Ramsden C, Andrianopoulos N, Jolley D, Bawden K, Doherty R, Kotsanas D, Bradford J, Buttery JP. 2010. An outbreak of necrotizing enterocolitis associated with norovirus genotype GII.3. *Pediatr Infect Dis J* 29:644–647. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e3181d824e1>.
18. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu TC, Ng AC, Storer CE, Head RD, Xavier R, Stappenbeck TS, Virgin HW. 2010. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn’s disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell* 141:1135–1145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.009>.
19. Capizzi T, Makari-Judson G, Steingart R, Mertens WC. 2011. Chronic diarrhea associated with persistent norovirus excretion in patients with chronic lymphocytic leukemia: report of two cases. *BMC Infect Dis* 11:131. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-11-131>.
20. Schwartz S, Vergoulidou M, Schreier E, Loddenkemper C, Reinwald M, Schmidt-Hieber M, Flegel WA, Thiel E, Schneider T. 2011. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell

- transplantation. *Blood* 117:5850–5856. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-12-325886>.
21. Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R., Chanock, R.M. (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* Vol. 10, p. 1075-1081.
 22. Green, K.Y., Chanock, R.M., Kapikian, A.Z., (2001). Human caliciviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol.1 (2 vols). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, p. 841-874.
 23. Glass R.I., M.D., Ph.D., Parashar U.D., M.D., M.P.H., and Estes M.K., Ph.D, (2009). *Norovirus Gastroenteritis*.
 24. T. J. Humphrey, J. G. Cruickshank, W. D. Cubitt, (1984). An outbreak of calicivirus associated gastroenteritis in an elderly persons home. A possible zoonosis?. *J. Hyg., Camb.*, 92, 293-299.
 25. Patel M.M., Hall A.J., Vinjé J., Parashar U.D., (2008). *Noroviruses: A comprehensive review*.
 26. Karst S.M. (2010). Pathogenesis of Noroviruses, *Emerging RNA Viruses*. *Viruses* 2010, 2, 748-781; doi:10.3390/v2030748. Op. Access viruses.
 27. Green, K.Y., Jiang, X.J. and Hansman, G.S., (2010). *Caliciviruses. Molecular and Cellular Virology*. Caister Academic Press. p. 27, 45 - 47.
 28. Tibor F., Cindy W.P.L., and Brittney F., (2014). Relationship between genotypes and serotypes of genogroup 1 reoviruses: a model for human norovirus antigenic diversity. *Journal of General Virology*, 95, 1469–1478.
 29. McFadden N., Bailey D., Carrara G., Benson A., Chaudhry Y., Shortland A., Heeney J., Yarovinsky F., Simmonds P., Macdonald A., Goodfellow I. (2011) *Norovirus Regulation of the Innate Immune Response and Apoptosis Occurs via the Product of the Alternative Open Reading Frame 4*. *PLoS Pathogens* Vol. 7.
 30. Abente E.J., Sosnovtsev S.V., Sandoval C., Parra G., Bok K., and Green K.Y. (2012). The feline calicivirus leader of the capsid protein is associated with cytopathic effect. *Journal of Virology* p. 3003–3017, Volume 87 Number 6.
 31. Simmonds, P., Ioannis Karakasilotis, Dalan Bailey, Yasmin Chaudhry, David J. Evans and Ian G. Goodfellow, (2008). *Bioinformatic and functional analysis of RNA*

- secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. 2530–2546 *Nucleic Acids Research*, Vol. 36, No. 8.
32. Sosnovtsev, S.V. and Green, K.Y. (2000) Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology* 277, 193–203.
 33. Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K. O., Prikhodko, V. G., Thackray, L. B., Wobus, C. E., Karst, S. M., Virgin, H. W. & Green, K. Y. (2006). Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol* 80, 7816-31.
 34. Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y. and Estes, M.K. (1992). Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* Vol. 66, p. 6527–6532.
 35. Green, K.Y., Mory, A., Fogg, M.H., Weisberg, A., Belliot, G., Wagner, M., Mitra, T., Ehrenfeld, E., Cameron, C.E. and Sosnovtsev, S.V. (2002) Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells. *J. Virol.* Vol. 76, p. 8582–8595.
 36. Ettayebi, K. and Hardy, M.E. (2003) Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J. Virol.* Vol. 77, p. 11790–11797.
 37. Weir, M.L., Klip, A. and Trimble, W.S. (1998) Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): a broadly expressed protein that binds to VAMP. *Biochem. J.* 333 (Pt 2), 247–251.
 38. Pfister, T. and Wimmer, E. (2001) Polypeptide p41 of a Norwalklike virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J. Virol.* 75, 1611–1619.
 39. Sosnovtsev S.V., Garfield M., and Green K.Y. (2002) Processing Map and Essential Cleavage Sites of the Nonstructural Polyprotein Encoded by ORF1 of the Feline Calicivirus Genome. *J. Virol.* 7060–7072.
 40. Yo Yumiketa, Takanori Narita, Yosuke Inoue, Go Sato, Wataru Kamitani, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Takemasa Sakaguchi, Yukinobu Tohya (2016). Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation. *Veterinary Microbiology* 185, 62–67.

41. Bernstein, H.D. and Baltimore, D. (1988) Poliovirus mutant that contains a cold-sensitive defect in viral RNA synthesis. *J. Virol.* Vol. 62, p. 2922–2928.
42. Doedens, J.R., Giddings Jr., T.H. and Kirkegaard, K. (1997) Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J. Virol.* Vol. 71, p. 9054–9064.
43. Burroughs, J.N. and Brown, F. (1978) Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA. *J. Gen. Virol.* Vol. 41, p. 443–446.
44. Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M.G. and Laliberte, J.F. (2000) Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J. Virol.* 74, 7730–7737.
45. Lellis, A.D., Kasschau, K.D., Whitham, S.A. and Carrington, J.C. (2002) Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr. Biol.* 12, 1046–1051.
46. Daughenbaugh, K., Fraser, C.S.H.J.W. and Hardy, M.E. (2003). The genome linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J.* Vol. 22, p. 2852–2859.
47. Chaudhry, Y., Nayak, A., Bordeleau, M.E., Tanaka, J., Pelletier, J., Belsham, G.J., Roberts, L.O., and Goodfellow, I.G. (2006). Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J. Biol. Chem.* Vol. 281, p. 25315 – 25325.
48. Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, Laliberte J-F, Roberts L. 2005. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Reports* 6(10):968–972 DOI 10.1038/sj.embor.7400510.
49. Chung L, Bailey D, Leen EN, Emmott EP, Chaudhry Y, Roberts LO, Curry S, Locker N, Goodfellow IG. 2014. Norovirus translation requires an interaction between the C terminus of the genome-linked viral protein VPg and eukaryotic translation initiation factor 4G. *Journal of Biological Chemistry* 289(31):21738–21750 DOI 10.1074/jbc.M114.550657.
50. Thumfart, J.O. and Meyers, G. (2002) Rabbit hemorrhagic disease virus: identification of a cleavage site in the viral polyprotein that is not processed by the known Calicivirus protease. *Virology* 304, 352–363.

51. Someya, Y., Takeda, N. and Miyamura, T. (2002) Identification of active-site amino acid residues in the Chiba virus 3C-like protease. *J. Virol.* 76, 5949–5958.
52. Hardy, M.E., Crone, T.J., Brower, J.E. and Ettayebi, K. (2002) Substrate specificity of the Norwalk virus 3C-like proteinase. *Virus Res.*, Vol. 89, p. 29–39.
53. Humoud, M. N., Doyle, N., Royall, E., Willcocks, M. M., Sorgeloos, F., van Kuppeveld, F., Roberts, L. O., Goodfellow, I. G., Langereis, M. A., and Locker N. (2016). Feline Calicivirus Infection Disrupts Assembly of Cytoplasmic Stress Granules and Induces G3BP1 Cleavage. *J Virol* 90:6489 –6501. doi:10.1128/JVI.00647-16.
54. Belliot, G., Sosnovtsev, S.V., Chang, K.O., Babu, V., Uche, U., Arnold, J.J., Cameron, C.E. and Green, K.Y. (2005) Norovirus proteinase-polymerase and polymerase are both active forms of RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* Vol. 79, p. 2393–2403.
55. Ng, K.K., Pendas-Franco, N., Rojo, J., Boga, J.A., Machin, A., Alonso, J.M. and Parra, F. (2004) Crystal structure of Norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft. *J. Biol. Chem.* 279, 16638–16645.
56. Prasad, B.V., Rothnagel, R., Jiang, X. and Estes, M.K. (1994). Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J. Virol.* 68, 5117–5125.
57. Bertolotti-Ciarlet, A., White, L.J., Chen, R., Prasad, B.V. and Estes, M.K. (2002) Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J. Virol.* Vol. 76, p. 4044–4055.
58. Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y. and Estes, M.K. (1992). Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* Vol. 66, p. 6527–6532.
59. Prasad, B.V., Hardy, M.E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G. and Estes, M.K. (1999) X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286, 287–290.
60. Tan, M., Huang, P., Meller, J., Zhong, W., Farkas, T. and Jiang, X. (2003) Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J. Virol.* 77, 12562–12571.

61. Hutson, A. M., Atmar, R. L., and Estes, M. K. (2004). Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* Vol. 12, p. 279-287.
62. Seah, E.L., Gunsekere, I.C., Marshall, J.A. and Wright, P.J. (1999) Variation in ORF3 of genogroup 2 Norwalk-like viruses. *Arch. Virol.* 144, 1007–1014.
63. Glass, P.J., White, L.J., Ball, J.M., Leparc-Goffart, I., Hardy, M.E. and Estes, M.K. (2000) Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J. Virol.* Vol. 74, p. 6581–6591.
64. Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Chang, K.O., Onwudiwe, O. and Green, K.Y. (2004) Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J. Virol.* 79, 4012–4024.
65. Hutson, A. M., Atmar, R. L., Graham, D. Y., and Estes, M. K. (2002). Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J. Infect. Dis.* Vol. 185, p. 1335–1337.
66. Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, Ruvoen, S., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., Pendu, J.L., and Baric, R. (2003). Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat. Med.* 9:548–553.
67. Makino, A., Shimojima, M., Miyazawa, T., Kato, K., Tohya, Y. and Akashi, H. (2006). Junctional Adhesion Molecule 1 Is a Functional Receptor for Feline Calicivirus. *J. Virol.* p. 4482–4490.
68. Tamura, M., Natori, K., Kobayashi, M., Miyamura, T. and Takeda, N. (2000). Interaction of recombinant norwalk virus particles with the 105-kilodalton cellular binding protein, a candidate receptor molecule for virus attachment. *J. Virol.* Vol. 74 p. 11589 –11597.
69. Marsh, M., Helenius, A., (2006). Virus entry: open sesame. *Cell* 124 (4), 729-740.
70. Cantin, C., Holguera, J., Ferreira, L., Villar, E., Munoz-Barroso, I., (2007). Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* Vol. 88 (Pt 2), p. 559–569.
71. Liebl, D., Difato, F., Hornikova, L., Mannova, P., Stokrova, J., Forstova, J. (2006). Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. *J. Virol.* 80 (9), 4610–4622.

72. Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A., (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* 3 (5), 473–483.
73. Kreutz, L.C., Seal, B.S. (1995). The pathway of feline calicivirus entry. *Virus Res.* 35 (1), 63–70.
74. Stuart, A.D., Brown, T.D. (2006). Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *J. Virol.* 80 (15), 7500–7509.
75. Wobus, C.E., Perry, J.W., Taube, S. (2009). Murine norovirus-1 entry into permissive macrophages and dendritic cells is pH-independent. *Virus research* 143. Pág. 125-129.
76. Wobus, C.E., Perry, J.W. (2010). Endocytosis of Murine Norovirus 1 into Murine Macrophages Is Dependent on Dynamin II and Cholesterol. *J. Virol.* Pág. 6163-6176.
77. Gerondopoulos, A., Jackson, T., Monaghan, P., Doyle, N. and Roberts, L.O. (2010). Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- and cholesterol-dependent pathway. *J. Gen. Virol.*, Vol. 91, p. 1428–1438.
78. Naslavsky, N., Weigert, R., Donaldson, J.G., (2004). Characterization of a non clathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol. Biol. Cell* 15, 3542–3552.
79. Sharma, D.K., Choudhury, A., Singh, R.D., Wheatley, C.L., Marks, D.L., Pagano, R.E. (2003). Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling. *J. Biol. Chem.* 278, 7564–7572.
80. Grove, J., Marsh, M., (2011). The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J. Cell Biol.* 195, 1071–1082.
81. Shivanna, V., Kim, Y., and Chang KO (2014). Endosomal acidification and cathepsin L activity is required for calicivirus replication. *Virology* 464-465 287–295.
82. Tsai, B. (2007). Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 23, 23–43.
83. Hyde, J. L., et al. (2009). Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. *J. Virol.* Vol. 83, p. 8709–8719.

84. Hiscox, J. A. (2002). The nucleolus—a gateway to viral infection? *Arch. Virol.* Vol. 147, p. 1077–1089.
85. Hiscox, J. A. (2007). RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nature Rev.* Vol. 5, p. 119–127.
86. Ahlquist, P., Noueir, A. O., Lee, W. M., Kushner, D. B., and Dye, B. T. (2003). Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J. Virol.* Vol. 77, p. 8181–8186.
87. Gutiérrez-Escolano, A. L., Uribe-Brito, Z., del Ángel, R. M. and Jiang, X. (2000). Interaction of cellular proteins with the 5′ end of Norwalk virus genomic RNA. *J. Virol.*, Vol. 74, p. 8558–8562.
88. Gutiérrez-Escolano, A. L., Vázquez-Ochoa, M., Escobar-Herrera, J. and Hernández-Acosta, J. (2003). La, PTB, and PAB proteins bind to the 3′ untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 311, p. 759–766.
89. Karakasiliotis I., Vashist S., Bailey D., Abente E.J., Green K.Y., Roberts L.O., Sosnovtsev S.V., Goodfellow I.G. (2010). Polypyrimidine Tract Binding Protein Functions as a Negative Regulator of Feline Calicivirus Translation. *PLoS one* Vol. 5, Issue 3, p. e9562 1-17.
90. López-Manríquez, L., Vashist, S., Ureña, L., Goodfellow, I., Chavez, P., Mora-Heredia, J.E., Cancio-Lonches, C., Garrido, E., and Gutiérrez-Escolano, A.L. (2013). Norovirus Genome Circularization and Efficient Replication Are Facilitated by Binding of PCBP2 and hnRNP A1. *J. Virol.* p. 11371–11387, Vol. 87 Num. 21.
91. Alvarado-Hernández, B., Sandoval-Jaime, C., Sosnovtsev, S.V., Green, K.Y., and Gutiérrez-Escolano, A.L. (2015). Nucleolin promotes in vitro translation of feline calicivirus genomic RNA. *Virol.* 489, 51–62.
92. Cancio-Lonches, C., Yocupicio-Monroy, M., Sandoval-Jaime, C., Galvan-Mendoza, I., Ureña, L., Vashist, S., Goodfellow, I., Salas-Benito, J. and Gutiérrez-Escolano, A. L. (2011). 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.*, Vol. 85, p. 8056-68.

93. Amineva, S.P., Aminev, A.G., Palmenberg, A.C. and Gern, J. E. (2004). Rhinovirus 3C protease precursors 3CD and 3CD9 localize to the nuclei of infected cells. *J. Gen. Virol.*, 85, 2969–2979
94. Nakielny, S., and Dreyfuss, G. (1999). Transport of Proteins and RNAs in and out of the Nucleus. *Cell*, Vol. 99, 677–690.
95. Belov, G.A., Evstafieva, A.G., Rubtsov, Y.P., Mikitas, O.V., Vartapetian, A.B. and Agol, V.I. (2000). Early Alteration of Nucleocytoplasmic Traffic Induced by Some RNA Viruses. *Virology* Vol. 275, p. 244-248.
96. Spriggs, K., Bushell, M., Mitchell, S., and Willis, A. (2005). Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES trans-acting factors. *Cell Death Diff.* 12, 585–591. doi: 10. 1038/sj. cdd. 4401642.
97. Flather, D. and Semler, B. (2015). Picornaviruses and nuclear functions: targeting a cellular compartment distinct from the replication site of a positive-strand RNA virus. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 6, Article 594.
98. Waggoner, S., Sarnow, P., (1998). Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocalization of nucleolin in poliovirus-infected cells. *Journal of Virology* 72(8), 6699-6709.
99. Gustin, K.E., Sarnow, P., (2002). Inhibition of nuclear import and alteration of nuclear pore complex composition by rhinovirus. *Journal of Virology* 76(17), 8787-8796.
100. Back, S.H., Kim, Y.K., Kim, W.J., Cho, S., Oh, H.R., Kim, J.E., Jang, S.K., (2002). Translation of polioviral mRNA is inhibited by cleavage of polypyrimidine tract-binding proteins executed by polioviral 3C(pro). *Journal of Virology* 76(5), 2529-2542.
101. Meerovitch, K., Svitkin, Y.V., Lee, H.S., Lejbkowitz, F., Kenan, D.J., Chan, E.K.L., Agol, V.I., Keene, J.D., Sonenberg, N., (1993). La Autoantigen Enhances and Corrects Aberrant Translation of Poliovirus Rna in Reticulocyte Lysate. *Journal of Virology* 67(7), 3798-3807.
102. Ghildyal, R., Jordan, B., Li, D.S., Dagher, H., Bardin, P.G., Gern, J.E., Jans, D.A., 2009. Rhinovirus 3C Protease Can Localize in the Nucleus and Alter Active and Passive Nucleocytoplasmic Transport. *Journal of Virology* 83(14), 7349-7352.

103. Gustin, K.E., Sarnow, P., 2001. Effects of poliovirus infection on nucleocytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *Embo Journal* 20(1-2), 240-249.
104. Park, N., Katikaneni, P., Skern, T., Gustin, K.E., 2008. Differential targeting of nuclear pore complex proteins in poliovirus-infected cells. *Journal of Virology* 82(4), 1647-1655.
105. Walker, E.J., Younessi, P., Fulcher, A.J., McCuaig, R., Thomas, B.J., Bardin, P.G., Jans, D.A., Ghildyal, R., 2013. Rhinovirus 3C Protease Facilitates Specific Nucleoporin Cleavage and Mislocalisation of Nuclear Proteins in Infected Host Cells. *Plos One* 8(8).
106. Watters, K., Palmenberg, A.C., 2011. Differential Processing of Nuclear Pore Complex Proteins by Rhinovirus 2A Proteases from Different Species and Serotypes. *Journal of Virology* 85(20), 10874-10883.
107. D'Angelo, M.A.; Hetzer, M.W. Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol.* 2008, 18, 456–466. [CrossRef] [PubMed].
108. Cook, A.; Bono, F.; Jinek, M.; Conti, E. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu. Rev. Biochem.* 2007, 76, 647–671. [CrossRef] [PubMed].
109. Macara, IG (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 570–594.
110. Schwartz, TU, (2005). Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 221–226.
111. Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M., Zhang, W., Kipper, J., Devo, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B.T., Sali A. and Rout M.P. (2007). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature London* Vol. 450, 695–701.
112. Pemberton, L.F., and Paschal, B.M. (2005). Mechanisms of receptor mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic (Oxford,U. K.)* 6, 187–198.
113. Izaurralde E., Adam S. (1998). Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *RNA* Vol. 4, p. 351–367.

114. Robbins, J, Dilworth, SM, Laskey, RA, and Dingwall, C (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64, 615–623.
115. Moroianu, J. (1999). Nuclear Import and Export Pathways. *Journal of Cellular Biochemistry Supplements* 32/33:76–83.
116. Lee, B.J., Cansizoglu, A.E., Süel, K.E., Louis, T.H., Zhang, Z., and Chook, Y.M. (2006). Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* 126, 543–558.
117. Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I.W., (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* Vol. 90, p. 1051–1060.
118. Kalab, P, Weis, K, and Heald, R. (2002). Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* Vol. 295, p. 2452–2456.
119. Steggerda, S.M., Black, B.E., and Paschal, B.M. (2000). Monoclonal antibodies to NTF2 inhibit nuclear protein import by preventing nuclear translocation of the GTPase Ran. *Mol. Biol. Cell* 11, 703–719.
120. Mohamed El-Tanani , El-Habib Dakir, Bethany Raynor and Richard Morgan (2016). Mechanisms of Nuclear Export in Cancer and Resistance to Chemotherapy. *Cancers* 2016, 8, 35; doi:10.3390/cancers8030035.
121. Köhler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F.R., Prehn, S., Haller, H., Görlich, D., and Hartmann, E. (1999). Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7782–7791.
122. Lee, S.J., Sekimoto, T., Yamashita, E., Nagoshi, E., Nakagawa, A., Imamoto, N., Yoshimura, M., Sakai, H., Chong, K.T., Tsukihara, T. and Yoneda Y. (2003). The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science* 302, 1571–1575.
123. Terry, L.J.; Wentz, S.R. Flexible gates: Dynamic topologies and functions for fg nucleoporins in nucleocytoplasmic transport. *Eukaryot. Cell* 2009, 8, 1814–1827. [CrossRef] [PubMed].

124. Jamali T., Jamali Y., Mehrbod M., and Mofrad M.R.K. (2011). Nuclear Pore Complex: Biochemistry and biophysics of nucleocytoplasmic transport in health and disease. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, Vol. 287, Chap. 6, p. 233-286
125. Wentz, S.R., and Rout, M.P. (2010). The Nuclear Pore Complex and Nuclear Transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Oct; 2(10): a000562. doi: 10.1101/cshperspect.a000562.
126. Aitchison, J.D., and Rout, M.P. (2012). The Yeast Nuclear Pore Complex and Transport Through It. *Genetics*, Vol. 190, 855–883.
127. Chatel, G., and Fahrenkrog, B. (2012). Dynamics and diverse functions of nuclear pore complex proteins. *Nucleus* 3:2, 162–171, Volume 3 Issue 2.
128. Raices, M., and D'Angelo, M.A. (2012). Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. Vol. 13.
129. Fornerod, M.; Ohno, M.; Yoshida, M.; Mattaj, I.W. Crm1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 1997, 90, 1051–1060.
130. Stade, K.; Ford, C.S.; Guthrie, C.; Weis, K. Exportin 1 (crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 1997, 90, 1041–1050.
131. Gruter, P.; Taberner, C.; von Kobbe, C.; Schmitt, C.; Saavedra, C.; Bachi, A.; Wilm, M.; Felber, B.K.; Izaurralde, E. Tap, the human homolog of mex67p, mediates cte-dependent rna export from the nucleus. *Mol. Cell* 1998, 1, 649–659.
132. Sandri-Goldin, R.M. Viral regulation of mrna export. *J. Virol.* 2004, 78, 4389–4396.
133. Fontoura, B.M.; Faria, P.A.; Nussenzveig, D.R. Viral interactions with the nuclear transport machinery: Discovering and disrupting pathways. *IUBMB Life* 2005, 57, 65–72.
134. Gustin, K.E. Inhibition of nucleocytoplasmic trafficking by rna viruses: Targeting the nuclear pore complex. *Virus Res.* 2003, 95, 35–44.
135. Park, N., Skern, T., Gustin, K.E., 2010. Specific Cleavage of the Nuclear Pore Complex Protein Nup62 by a Viral Protease. *Journal of Biological Chemistry* 285(37), 28796-28805.

136. Ferrando-May, E., Cordes, V., Biller-Ckovric, I., Mirkovic, J., Gorlich, D., Nicotera, P., 2001. Caspases mediate nucleoporin cleavage, but not early redistribution of nuclear transport factors and modulation of nuclear permeability in apoptosis. *Cell Death Differ* 8(5), 495-505.
137. Faleiro, L., and Lazebnik, Y. (2000). Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J. Cell Biol.* 151, 951–960. doi: 10.1083/jcb. 151.5.951.
138. Belov G.A., Lidsky P.V., Mikitas O.V., Egger D., Lukyanov K.A. and Bienz, K. (2004). Bidirectional increase in permeability of nuclear envelope upon poliovirus infection and accompanying alterations of nuclear pores. *J Virol*, Vol. 78, p. 10166–10177.
139. Cohen, S., Etingov, I., Pante, N., 2012. Effect of Viral Infection on the Nuclear Envelope and Nuclear Pore Complex. *Int Rev Cel Mol Bio* 299, 117-159.
140. Natoni, A., Kass, G.E.N., Carter, M.J. and Roberts, L.O. (2006). The mitochondrial pathway of apoptosis is triggered during feline calicivirus infection. *J. Gen. Virol.*, Vol. 87, 357-361.
141. Boniotti, B., Wirblich, C., Sibilja, M., Meyers, G., Thiel, H.J., Rossi, C., 1994. Identification and Characterization of a 3c-Like Protease from Rabbit Hemorrhagic-Disease Virus, a Calicivirus. *Journal of Virology* 68(10), 6487-6495.
142. Neill, J.D., 1990. Nucleotide-Sequence of a Region of the Feline Calicivirus Genome Which Encodes Picornavirus-Like Rna-Dependent Rna-Polymerase, Cysteine Protease and 2c Polypeptides. *Virus Research* 17(3), 145-160.
143. Escobar-Herrera, J., Medina-Ramirez, F.J., Gutierrez-Escolano, A.L., 2007. A carboxymethyl-cellulose plaque assay for feline calicivirus. *Journal of Virological Methods* 146(1-2), 393-396.
144. Yarbrough, M.L., Mata, M.A., Sakthivel, R., Fontoura, B.M., 2014a. Viral subversion of nucleocytoplasmic trafficking. *Traffic* 15(2), 127-140.
145. Deszcz, L., J. Seipelt, E. Vassilieva, A. Roetzer, and E. Kuechler (2004). Antiviral activity of caspase inhibitors: effect on picornaviral 2A proteinase. *FEBS Lett.* 560:51–55.
146. Blakeney, S.J., Cahill, A., Reilly, P.A., 2003. Processing of Norwalk virus nonstructural proteins by a 3C-like cysteine proteinase. *Virology* 308(2), 216-224.

147. Timmer, J.C., Salvesen, G.S., 2007. Caspase substrates. *Cell Death Differ* 14(1), 66-72.
148. Cordingley, M.G., Register, R.B., Callahan, P.L., Garsky, V.M., Colonno, R.J., 1989. Cleavage of small peptides in vitro by human rhinovirus 14 3C protease expressed in *Escherichia coli*. *J Virol* 63(12), 5037-5045.
149. Someya, Y., Takeda, N., Miyamura, T., 2005. Characterization of the norovirus 3C-like protease. *Virus Research* 110(1-2), 91-97.
150. Sosnovtsev, S.V., Sosnovtseva, S.A., Green, K.Y., 1998. Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *Journal of Virology* 72(4), 3051-3059.
151. Herod, M.R., Salim, O., Skilton, R.J., Prince, C.A., Ward, V.K., Lambden, P.R., and Clarke, I.N. (2014). Expression of the Murine norovirus (MNV) ORF1 polyprotein is sufficient to induce apoptosis in a virus-free cell model. *PLoS ONE* 9(3): e90679. doi:10.1371/journal.pone.0090679, Vol. 9, Issue 3, e90679.
152. Royall, E. and Locker, N. (2016). Translational Control during Calicivirus Infection. *Viruses* 2016, 8, 104; doi:10.3390/v8040104.
153. Subba-Reddy, C.V., Yunus, M.A., Goodfellow, I.G. and Kaoa, C.C. (2012). Norovirus RNA Synthesis Is Modulated by an Interaction between the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase and the Major Capsid Protein, VP1. *J. Virol.* p. 10138 – 10149, Vol.81 No. 18.
154. Funasaka, T., Tsuka, E. and Wong, R.W. (2012). Regulation of autophagy by nucleoporin Tpr. *Scientific Reports*, 2:878, DOI: 10.1038/srep00878
155. Borghese, F., Michiels, T., 2011. The Leader Protein of Cardioviruses Inhibits Stress Granule Assembly. *Journal of Virology* 85, 9614-9622.
156. Guil, S., Long, J.C., Caceres, J.F., 2006. hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol Cell Biol* 26, 5744-5758.
157. Watters, K., Palmenberg, A.C., 2011. Differential Processing of Nuclear Pore Complex Proteins by Rhinovirus 2A Proteases from Different Species and Serotypes. *Journal of Virology* 85, 10874-10883.
158. Huang, W.R., Chiu, H.C., Liao, T.L., Chuang, K.P., Shih, W.L., Liu, H.J., 2015. Avian Reovirus Protein p17 Functions as a Nucleoporin Tpr Suppressor

- Leading to Activation of p53, p21 and PTEN and Inactivation of PI3K/AKT/mTOR and ERK Signaling Pathways (vol 10, e0133699, 2015). Plos One 10.
159. David-Watine, B., 2011. Silencing Nuclear Pore Protein Tpr Elicits a Senescent-Like Phenotype in Cancer Cells. Plos One 6.
160. Nguyen, K.T., Holloway, M.P., Altura, R.A., 2012. The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. International journal of biochemistry and molecular biology 3, 137-151.
161. van der Watt, P.J., Maske, C.P., Hendricks, D.T., Parker, M.I., Denny, L., Govender, D., Birrer, M.J., Leaner, V.D., 2009. The Karyopherin proteins, Crm1 and Karyopherin beta1, are overexpressed in cervical cancer and are critical for cancer cell survival and proliferation. Int J Cancer 124, 1829-1840.
162. Broker, L.E., Kruyt, F.A.E., Giaccone, G., 2005. Cell death independent of caspases: A review. Clin Cancer Res 11, 3155-3162.
163. Furman, L.M., Maaty, W.S., Petersen, L.K., Ettayebi, K., Hardy, M.E., Bothner, B., 2009. Cysteine protease activation and apoptosis in Murine norovirus infection. Virology Journal 6.
164. Belmokhtar, C.A., Hillion, J., Segal-Bendirdjian, E., 2001. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. Oncogene 20, 3354-3362.
165. Johansson, A.C., Steen, H., Ollinger, K., Roberg, K., 2003. Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. Cell Death Differ 10, 1253-1259.
166. Leist, M., Jaattela, M., 2001. Triggering of apoptosis by cathepsins. Cell Death Differ 8, 324-326.
167. Minarowska, A., Minarowski, L., Karwowska, A., Gacko, M., 2007. Regulatory role of cathepsin D in apoptosis. Folia Histochem Cyto 45, 159-163.
168. Rintahaka, J., Lietzen, N., Ohman, T., Nyman, T.A., Matikainen, S., 2011. Recognition of Cytoplasmic RNA Results in Cathepsin-Dependent Inflammasome Activation and Apoptosis in Human Macrophages. J Immunol 186, 3085-3092.