



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR**

**“La proteína Anexina A2 se asocia con el RNA del  
FCV en los complejos de replicación y participa en  
la replicación viral”**

**T E S I S**

**Que presenta**

**M. en C. Juan Carlos Santos Valencia**

**Para obtener el grado de**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**en**

**Infectómica y Patogénesis Molecular**

**Directora de Tesis:** Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Ciudad de México

Agosto, 2018

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la ayuda económica brindada durante la realización de este proyecto. Gracias por impulsar y fortalecer el desarrollo de nuevo talento científico en México.

## **Agradecimientos**

Quiero utilizar espacio para agradecer desde lo más profundo de mi corazón a la mente detrás de este proyecto, que sin su invaluable ayuda, apoyo y comprensión simplemente no hubiera sido posible concluirlo, GRACIAS Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano. Sinceramente le agradezco haberme aceptado como su discípulo y enseñarme lo maravillosa que es la ciencia cuando se hace con el corazón y que ser cabeza de grupo no significa solo velar por los intereses de un laboratorio, sino también por el bienestar de todo el grupo de trabajo. Gracias por hacer que mi estancia en su laboratorio fuera una experiencia sensacional.

De igual modo, mi más profundo agradecimiento a la Dra. Clotilde Cancio Lonches por su invaluable ayuda en la realización de este proyecto, por las técnicas de laboratorio que amablemente me enseñó, y por su disposición en la elaboración de este proyecto. Gracias por tu ayuda y asesoría.

Gracias a mi Familia por siempre estar ahí, echándome porras. Quiero que sepan que gran parte de lo que soy, lo soy por ustedes y para ustedes. Los amo demasiado.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por las platicas sin sentido que tuvimos, los sueños de grandeza que compartimos y por la ayuda que nos brindamos. Gracias por su complicidad en muchos momentos en que los necesite. Les auguro la mejor de las suertes a todos.

Especial agradecimiento a mis amigos David, Cinthia, Adrián y Beatriz por tantos momentos juntos y por el apoyo incondicional que recibí de ellos. Espero que la vida nos permita volvernos a encontrar para seguir soñando y remediar el mundo juntos.

Gracias a todos por permitirme ser parte de su vida.

## Contenido

Resumen .....	1
Summary .....	2
Introducción .....	3
Antecedentes generales .....	7
Calicivirus Felino .....	7
Biología Molecular del FCV .....	8
Ciclo replicativo .....	10
Unión y entrada .....	10
Traducción y replicación viral .....	11
Morfogénesis y Salida viral .....	15
Antecedentes particulares .....	16
La familia de las proteínas anexinas .....	17
AnxA2 .....	18
AnxA2 y su unión a membranas .....	19
AnxA2 es una ribonucleoproteína .....	24
AnxA2 y su participación en la replicación viral .....	25
Antecedentes directos .....	31
Justificación .....	32
Materiales y métodos .....	36

Propagación y mantenimiento de célula CrFK.....	36
Infección y propagación del FCV .....	36
Electroforesis en geles de doble dimensión (2D) .....	37
Interferencia del RNAm de AnxA2 mediante el uso de siRNAs .....	37
Ensayo de viabilidad en células interferidas .....	39
Extractos celulares totales .....	39
Cuantificación del FCV mediante ensayos de plaqueo .....	40
Ensayos tipo Western Blot .....	40
Detección de AnxA2 de superficie celular por ensayos con biotina .....	41
Ensayos tipo VOPBA .....	42
Ensayos de Inmunofluorescencia .....	42
Aislamiento de los CR.....	43
Ensayos de Inmunoprecipitación .....	43
Análisis de cambio de movilidad electroforética (EMSA) .....	44
Microscopia electrónica .....	44
Resultados.....	46
La interferencia de AnxA2 modifica la producción de proteínas virales y de partículas virales en el sobrenadante de las células infectadas.....	49
AnxA2 se expresa en la superficie de las células CrFK y no interacciona con los viriones del FCV .....	53
Los niveles de AnxA2 y su distribución no se modifican durante la infección .....	55
AnxA2 está presente en los complejos de replicación formados por el FCV en células infectadas .....	58
AnxA2 colocaliza con el RNA del FCV en células infectadas .....	67
AnxA2 se asocia con el RNA del FCV en las fracciones de los CR de células infectadas.....	68
AnxA2 se asocia con la RNT 3' del RNA del FCV .....	70
La interferencia de AnxA2 causa una reducción en la síntesis de proteínas virales.....	72
La interferencia de AnxA2 causa una reducción del RNA del FCV.....	74
La disminución de la expresión de AnxA2 reduce la salida de partículas.....	75

Discusión	77
Conclusión	84
Anexo A	85
Perspectivas	90
Referencias	91

## Resumen

Se ha identificado que algunas proteínas celulares participan en la replicación de calicivirus debido a su asociación con proteínas virales y/o los ARN virales. Mediante espectrometría de masas, a partir de ensayos de pull-down, identificamos varias proteínas celulares unidas al ARN genómico del calicivirus felino (FCV), una de ellas se identificó como Anexina A2 (AnxA2), proteína andamio asociada a balsas lipídicas. AnxA2 colocaliza con la proteína NS6/7 del FCV y con el dsRNA en células infectadas; además, se encontró asociada con el ARN viral en la fracción de membrana correspondiente a los complejos de replicación (CR), lo que sugiere su papel durante la replicación del FCV. AnxA2-knockdown de las células CrFK antes de la infección con el FCV causó una fuerte reducción de proteínas virales no estructurales (NS) y en la producción del dsRNA, además de un retraso en el efecto citopático y una disminución significativa del rendimiento de FCV tanto en las fracciones asociadas como sobrenadantes. Tomados en conjunto, estos resultados indican que AnxA2 se requiere para una replicación eficiente del FCV.

## Summary

Some cellular proteins have been identified to participate in calicivirus replication because of its association with viral proteins and/or the viral RNAs. By mass spectrometry from pull-down assays, we identify several cellular proteins bound to the feline calicivirus (FCV) genomic RNA, one of them the lipid raft-associated scaffold protein Annexin (Anx) A2. AnxA2 colocalizes with FCV NS6/7 protein and with the dsRNA in infected cells; moreover, it was found associated with the viral RNA in the membrane fraction corresponding to the replication complexes (RCs), suggesting its role during FCV replication. AnxA2-knockdown from CrFK cells prior to infection with FCV caused a strong reduction of viral non-structural (NS) proteins and dsRNA production, a delay in the cytopathic effect and a significant decrease of FCV yield in both cell-associated and supernatant fractions. Taken together, these results indicate that AnxA2 is required for an efficient FCV replication.



## **Introducción**

La gastroenteritis infecciosa se origina por la inflamación de las mucosas del tracto gastrointestinal derivando en diarrea de inicio rápido, acompañada o no de náuseas, vómito, fiebre y dolor abdominal (1). La gastroenteritis afecta a todas las personas de todas las áreas geográficas del mundo; sin embargo, algunos factores como la edad y el agente etiológico pueden definir su curso clínico (2).

La mayoría de los niños de los países occidentales tienen al menos un episodio de diarrea aguda antes de cumplir un año, por lo que la gastroenteritis aguda sigue siendo un motivo de consulta frecuente, tanto en los centros de salud como en los servicios de urgencia de los hospitales (3). La Organización Mundial de la Salud estima que en el 2003, 1.87 millones de niños menores de cinco años murieron por diarrea; muchas de estas muertes ocurrieron como consecuencia de la deshidratación (4).

En adultos, aunque las manifestaciones de la enfermedad duran aproximadamente dos días, el 52% de los episodios están asociados con la restricción de la actividad diaria, lo cual repercute en la actividad laboral y por lo tanto tiene un costo económico alto (5); de hecho, la prevalencia de las gastroenteritis provoca una carga económica significativa para el sistema de salud (6).

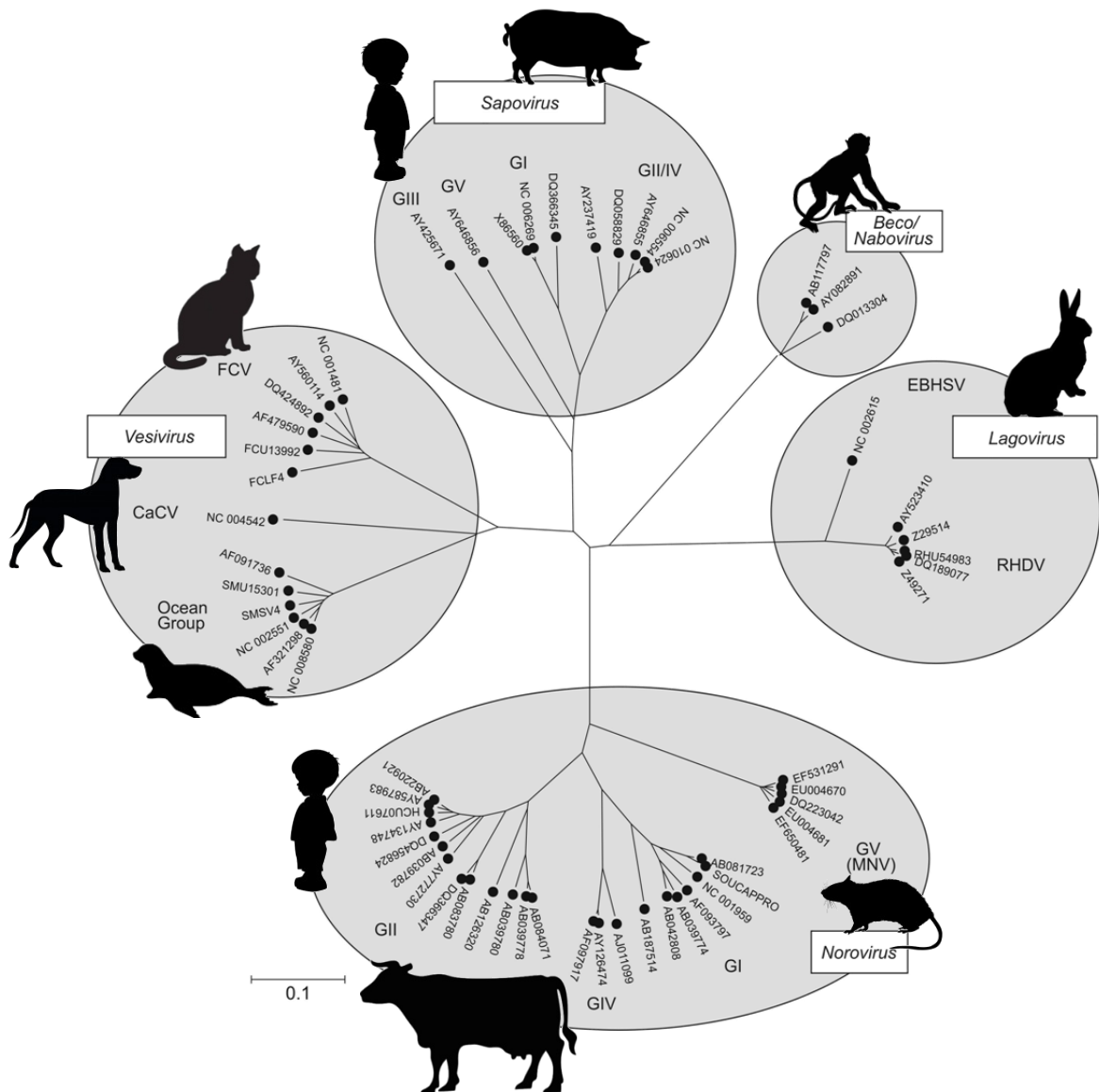
Existen más de 20 diferentes virus que han sido identificados como agentes etiológicos de gastroenteritis, entre los más comunes se incluyen a los rotavirus, norovirus, adenovirus y astrovirus (6); sin embargo, rara vez se identifica el agente etiológico durante un episodio de gastroenteritis aguda (7). Hasta hace poco, la gastroenteritis por norovirus se había considerado la segunda causa de hospitalización de infantes en el mundo, detrás de las gastroenteritis producidas por los rotavirus. Sin embargo, tras la inclusión de la vacuna contra las formas graves de la infección por rotavirus dentro de los programas de inmunización en los años 2006 y 2007, aunado al incremento del diagnóstico de norovirus en diversos países, se considera hoy en día a los norovirus humanos como la causa más común de los brotes de gastroenteritis aguda (8-10).

Los norovirus constituyen uno de los cinco géneros pertenecientes a la familia *Caliciviridae* (Fig. 1), la cual incluye patógenos causantes de gastroenteritis en humanos y diversos signos clínicos en animales vertebrados (p. ej. mamíferos, aves y animales marinos), como encefalitis, miocarditis, ulceraciones, rinitis, fiebre, diarrea, abortos, hepatitis, neumonía y hemorragias (11-14).

Los norovirus son virus pequeños (27 nm), icosaédricos, que no poseen envoltura, característica que los asemeja a otros virus entéricos humanos como poliovirus, coxsackievirus y echovirus, lo cual los hace resistentes al pH ácido del estómago y a la degradación ambiental (como cambios en el pH, inactivación térmica o luz solar) e inactivación química (como soluciones con cloro en dosis bajas y tiempos cortos) (15).

En 1929 se describen por primera vez las características clínicas de la enfermedad causada por los norovirus y se alude a su recurrencia durante el invierno (16). En 1954, se reconoció la transmisibilidad de la gastroenteritis por norovirus de pacientes a voluntarios saludables, pero no fue sino hasta

1972 cuando las partículas virales fueron descubiertas en muestras fecales obtenidas durante un brote de gastroenteritis en una escuela primaria de Norwalk, Ohio (17).



**FIGURA 1. FILOGRAMA DE LA FAMILIA CALICIVIRIDAE.** Dentro de la familia *Caliciviridae* existen cinco géneros: Beco/nabovirus, Lagovirus, Vesivirus, Norovirus y Sapovirus. Tomado de Simmonds et al., 2008.

Los norovirus, así como los sapovirus que infectan a humanos, son conocidos como calicivirus humanos (HuCV), y ninguno de ellos se han podido propagar en cultivos celulares o en un modelo animal conveniente (18), por lo que los humanos voluntarios y pacientes infectados en brotes, representan claramente el modelo más adecuado para el estudio epidemiológico. Sin embargo, para estudiar aspectos tales como la biología del virus, es imprescindible el uso de otros modelos animales (19).

Recientemente, Jones et al. desarrollaron un modelo de cultivo *in vitro* para el HuNov en donde se requiere la presencia de bacterias comensales *Enterobacter cloacae* que expresen antígenos de grupo histo-sanguíneo (HBGA; del inglés histo-blood group antigens), para estimular la infección de células B (20). Sin embargo, al utilizar el modelo de cerdos gnobióticos para probar la influencia de *E. cloacae* durante la infectividad del HuNov *in vivo*, se observó que las células B no eran blanco de la infección y que además, *E. cloacae* inhibía la infectividad del HuNov; sugiriendo que la presencia de esta enterobacteria intensifica la respuesta inmune, lo que reduce la infección viral (21).

En el 2016, se reportó el desarrollo de un modelo de cultivo para norovirus humanos en enteroides de intestino de humano, sin embargo este modelo apenas comienza a estandarizarse en algunos laboratorios, principalmente por las dificultades metodológicas y el alto costo (22).

Debido a la falta de un cultivo celular o un modelo animal que reproduzca eficientemente la infección del HuNov, se han utilizado otros miembros de la familia *Caliciviridae* como una alternativa de estudio que han permitido conocer más sobre la estructura, función y expresión genética viral (23). A este respecto, tanto el norovirus murino (MNV), como calicivirus felino (FCV), han sido particularmente útiles en el estudio de la biología y la patogenicidad de

este grupo de virus, dada la facilidad en su manejo y la similitud genética comparada con aquellos que infectan a humanos (15).

## **Antecedentes generales**

### **Calicivirus Felino**

El FCV es un patógeno que afecta tanto a felinos salvajes como domésticos, que provoca ulceraciones en la cavidad oral (paladar, encía y lengua) y nasal (24) e infecciones agudas en el tracto respiratorio. Se tienen reportes de que algunas cepas son capaces de causar cojera o artritis aguda (25). Por otro lado, el FCV ha sido aislado de felinos que presentan infecciones sistémicas atribuidas a la Inflamación de los vasos sanguíneos (vasculitis) y neumonía necrosante severa (26).

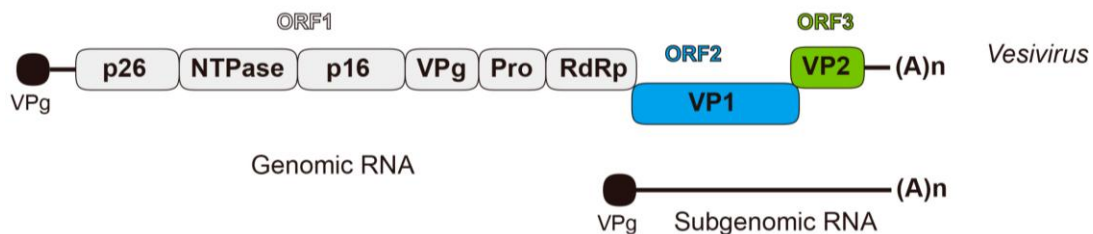
De los felinos infectados por el FCV, una proporción de los que logran superar los signos de la enfermedad continúan persistentemente infectados. Se cree que, en estos gatos, la evolución del virus ayuda a evadir la respuesta inmune y es probable que se conviertan en portadores a largo plazo, teniendo un papel crucial en la epidemiología del virus (12).

Más allá de su aplicación e importancia veterinaria, el estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales el FCV induce la enfermedad ha permitido avanzar en el conocimiento de su biología molecular y en la comprensión de la traducción y replicación de su genoma. Esto ha sido posible gracias a que se propaga fácilmente en cultivos celulares y a que existen clonas infecciosas disponibles (27). Su propagación en fibroblastos ha permitido no sólo contar con un excelente sistema de infección, sino también implementar técnicas de biología molecular, como la transfección (para los sistemas de reversa genética) o la interferencia genética (para el

apagado de genes), lo cual aún resulta complicado en modelos como el del MNV (19).

## Biología Molecular del FCV

El FCV, pertenece al género *Vesivirus*, y al igual que todos los miembros de la familia *Caliciviridae*, posee un genoma de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva, con un tamaño de aproximadamente 7.7 Kb. Su genoma no posee una CAP-5', sin embargo este se encuentra unido covalentemente a la proteína viral Vpg en el extremo 5' terminal, y está poliadenilado en el 3' terminal. Los vesivirus poseen tres marcos de lectura abierto (ORF, del inglés open reading frames) (Fig.2) (28).



**FIGURA 2. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DE FCV.** El RNA genómico del FCV contiene tres ORFs. El primero codifica para una poliproteína que da lugar a las proteínas no estructurales. Los ORF 2 y 3 codifican para proteínas estructurales de la cápside (VP1 y VP2, respectivamente). Tomado de Royall & Locker, 2016.

El ORF 1 codifica para una poliproteína que es procesada por la única proteasa viral (NS6/7), dando origen a las seis proteínas no estructurales (NS) maduras designadas como NS1 (p5.6), NS2 (p32), NS3 (p39), NS4 (p30), NS5 (p13 o VPg) y NS6/7 (p76 ó ProPol). De estas proteínas, el papel de NS1 de los calicivirus es desconocido y no se ha podido predecir con

base en su secuencia proteica debido a que no muestra homología con ninguna secuencia motivo funcional establecida (29). Por otro lado, se ha sugerido que NS2 (p32) podría funcionar en la formación del centro (Core) de los complejos de replicación (RC), anclando algunos de los otros componentes en sus respectivos lugares (30). Por su parte, la NS3 (p39) posee motivos de unión a nucleótidos trifosfatos que le podrían conferir actividad NTPasa (31-32). Asimismo, recientemente se demostró que p39 es capaz de suprimir la producción de IFN- $\beta$  mediante la inhibición de la activación del IRF-3 (33). Por lo que respecta a la NS4 (p30) se sabe que, al igual que p32 y p39, es una proteína integral de membrana y que tras su expresión, esta se localiza en el retículo endoplásmico (RE). Además, tras la expresión de p39 o p30 se ha observado la reorganización y el trastorno de la homeostasis del RE (34).

La NS5 (p13), también conocida como VPg, es una proteína que se encuentra unida covalentemente al extremo 5' del RNA genómico y subgenómico. Esta proteína, actúa como un cap proteinaceo y promueve el inicio de la traducción del genoma viral a través de su interacción directa con factores del inicio de la traducción eucariota (eIFs) (35).

La proteína NS6/7 (p76), que abarca los dominios de proteasa-polimerasa, se encuentra como un polipéptido bifuncional que no se procesa durante la infección y es la responsable de: 1) mediar el procesamiento de la poliproteína compuesta por las proteínas NS y del precursor de la proteína de la cápside (36-37) y 2) sintetizar los RNAs virales mediante su función de RNA polimerasa dependiente de RNA.

Aunque el RNA genómico contiene a los tres marcos de lectura abiertos, que codifican todas las proteínas virales, únicamente las proteínas no estructurales se traducen a partir de este, mientras que las proteínas

estructurales se traducen a partir de un RNA subgenómico, el cual contiene a los ORFs 2 y 3.

El ORF 2 codifica para un precursor de 73 kDa que es procesado rápidamente por la proteasa viral, dando como resultado la proteína estructural de la cápside VP1 de 62 kDa y una proteína de 125 aminoácidos presente en el N-terminal, conocida como proteína líder de la cápside (LC) (38-40). Esta última, se ha asociado con el efecto citopático producido por el FCV, identificando dos dominios, uno en el N-terminal asociado al redondeo y muerte de la célula; y otro en el C-terminal asociado a la propagación viral (41).

Por último, el ORF 3 codifica para la proteína estructural minoritaria de la cápside VP2, y aunque está presente en una o dos copias por virión, es esencial para la maduración y producción de viriones infectivos (12, 42).

## **Ciclo replicativo**

### **Unión y entrada**

El primer evento en la infección viral involucra la interacción del virus con el o los receptores de la superficie celular (Fig. 3). Se considera que los receptores virales son primordiales en la replicación viral, el tropismo por algún tejido y la patogénesis. La interacción entre un virus y su receptor está determinada por factores como la temperatura, pH y la presencia de cationes divalentes. La unión del FCV a células CrFK es independiente de la temperatura. Aunque, se ha observado que existe una mayor unión por parte del FCV a una temperatura de 4 °C que a 37 °C y que este se une en mayor proporción a las células en suspensión que a las células en monocapa; esto



probablemente debido a la mayor cantidad de receptores disponibles en la superficie celular para interaccionan con las proteínas virales (43).

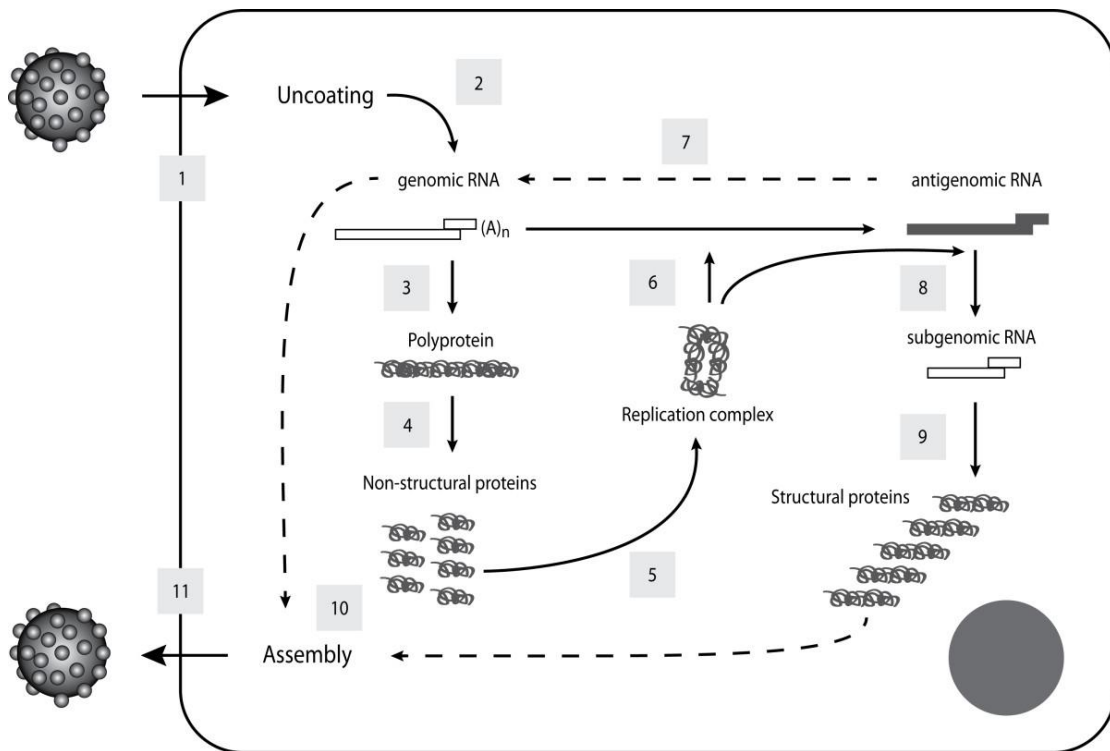
En el 2006, Makino et al. demostraron que al transfectar la molécula fJAM-1 (Junctional Adhesion Molecule 1) de felino a células no permisivas a la infección por el FCV, las volvía susceptibles a la infección. De igual modo, demostraron que la inhibición mediante el uso de anticuerpos específicos anti-fJAM-1 resultaba en la inhibición de la replicación viral en la célula, proporcionando evidencias de que la presencia de fJAM-1 determina la especificidad del FCV, al funcionar como receptor (44). fJAM-1 se distribuye ampliamente en diferentes tejidos de felino, localizándose en las uniones intercelulares de células epiteliales y endoteliales. Se ha observado que tras la infección por el FCV, fJAM-1 se redistribuye hacia el citosol de células epiteliales infectadas (45). Además, se ha descrito que existe un componente adicional para la unión del FCV; mediante la remoción del ácido siálico con neuraminidasa se observó una marcada reducción en la unión viral y la infectividad, demostrando que este monosacarido es un componente crucial durante la infección por el FCV (46).

Tras la unión viral, se lleva a cabo la internalización. En este punto se ha demostrado, mediante la inhibición de distintas rutas de entrada con diferentes fármacos, que la internalización del FCV en células CrFK ocurre por endocitosis mediada por clatrina (47); y que la desencapsidación del genoma, y su subsecuente acceso al citoplasma, se da por la acidificación de los endosomas en presencia de un pH bajo (47-48).

### **Traducción y replicación viral**

El genoma de los virus de RNA de polaridad positiva son la base para tres de los principales procesos durante la replicación; funcionan como RNAm para

la síntesis de las proteínas virales; actúan como molde para la replicación genómica; además, son integrados como el genoma viral en el interior de la cápside durante el ensamble viral (49).



**FIGURA 3. CICLO REPLICATIVO DEL FCV.** El virus se une a la molécula JAM-1 (presente en las uniones estrechas) para posteriormente ser endocitado vía clatrina. Se libera el RNA para dar lugar a la traducción de la poliproteína en el citoplasma y posteriormente a la replicación del genoma y subgenoma viral. El genoma viral se encapsida de manera concomitante a la formación de las cápside. La salida del virus se da por un proceso apoptótico vía mitocondrial (Abrantes et al., 2012).

Mientras que para la traducción en eucariontes, los RNAm comúnmente poseen una estructura cap; en todos los miembros de la familia *Caliciviridae*, tanto el RNA genómico como el subgenómico se encuentra unido a la proteína VPg (50). La liberación del genoma viral en el citoplasma induce la inhibición de la síntesis de proteínas propias de la célula (51). Este

mecanismo puede permitir al virus desviar la maquinaria de traducción celular de una traducción dependiente de cap a una traducción del RNA viral dependiente de VPg (12).

Los calicivirus usan una novedosa estrategia para el inicio de la traducción que involucra la interacción de factores de iniciación con la VPg. Se ha demostrado que la remoción del factor de inicio de la traducción eIF4E, disminuye notablemente la síntesis de proteínas virales (52), lo que indica que este factor es esencial para la traducción del FCV. De igual modo, la interacción eIF4G-eIF4E es esencial para una traducción viral eficiente. Se sabe que en la traducción dependiente de cap, el eIF4G actúa como puente entre el eIF4E y el complejo de unión al cap, facilitando el ensamble del complejo de inicio de la traducción dependiente de cap. Se considera que durante la infección por el FCV, el eIF4G es cortado y el producto de corte permanece unido al eIF4E, impidiendo su interacción con el eIF3 al retener el sitio de unión y por ende inhibiendo la traducción dependiente de cap (51).

Además de los factores canónicos de la traducción, muchos virus de RNA utilizan otras proteínas celulares para regular su traducción. Estas proteínas suelen interactuar con los extremos del RNA genómico viral, o inclusive en sitios codificantes. En este sentido, se ha demostrado que la proteína celular nucleolina, forma parte del complejo ribonucleoproteico (RNP) formado con el RNA genómico del FCV (53). En nuestro grupo de trabajo, se demostró que nucleolina interacciona directamente con las regiones no traducidas (UTR; del inglés untranslated regions) 5' y 3' del RNA genómico del FCV, regulando positivamente la traducción *in vitro* (54).

Por otro lado, se ha descrito que durante la traducción del FCV, la proteína de unión de trectos de polipirimidinas o PTB actúa regulando negativamente dicho proceso (55). Se propone que durante las etapas iniciales de la infección, el RNA viral se traduce en ausencia de la PTB; una vez que los

niveles de las proteínas virales aumentan en concentración, aumenta la concentración citoplásmica de la PTB debido a la alteración en el transporte nucleocitoplásmico (Mora Heredia, datos en preparación). Ya en el citoplasma, la PTB interactúa con la región terminal 5' del genoma y subgenoma viral, impidiendo la traducción y permitiendo el inicio de la replicación del RNA viral (55).

La replicación del RNA viral ocurre en el citoplasma de las células infectadas, específicamente en la superficie de pequeñas vesículas membranosas conocidas como complejos de replicación, CR (56). La formación de estos CR ocurre mediante interacciones complejas proteína-proteína, en las que participan tanto proteínas virales, como proteínas de la célula hospedera (52).

Durante la infección de células CrFK (Crandell-Rees feline kidney) y FEmb (feline embryo) por el FCV, se ha observado la formación de vesículas unidas a membrana en el citoplasma, en donde se pueden identificar partículas virales asociadas a estas áreas de proliferación membranal, sugiriendo que estos son los sitios de replicación viral (57-58). El aislamiento de estas estructuras y su subsecuente interacción con ribonucleótidos y sales de magnesio, en un sistema regenerador de ATP, mostró su capacidad para sintetizar RNA viral *in vitro*. Tras demostrar su actividad enzimática, estas estructuras aisladas de células infectadas son reconocidas como los CR del FCV (59).

Asociadas a los CR que se producen tras la infección por el FCV, han sido aisladas e identificadas proteínas precursoras de las NS, como la p30-VPg y, proteínas NS maduras, tales como la proteasa polimerasa NS6/7, p32, p30 y p39. Además se ha detectado la presencia de las proteínas estructurales VP1 y VP2 (34, 59).

La participación de proteínas celulares y virales permite que el RNA genómico sea utilizado como molde para la síntesis de RNAs de cadena negativa, los cuales sirven como intermediario para la síntesis de RNAs de cadena positiva. Estos últimos podrán formar parte del genoma de la siguiente generación de virus o iniciarán nuevamente otro ciclo de traducción y replicación. Este RNA de cadena positiva también constituye el molde para la síntesis del RNA subgenómico, a partir del cual se sintetizan las proteínas estructurales (11).

### **Morfogénesis y Salida viral**

La presencia de proteínas estructurales en los CR se debe a que es en estos sitios en donde se sintetizan los RNAs subgenómicos que les dan origen, junto con el RNA genómico de la progenie viral. La proteína VP1, es procesada y tiene la capacidad de autoensamblarse, por lo que la encapsidación del genoma viral es concomitante a la formación de la cápside. Una vez encapsidado el genoma, las partículas virales pueden salir de la célula hospedera.

Los efectos que tiene el FCV sobre las células son fulminantes y entre las 6 y 8 h después de la infección de cultivos celulares, estas se encuentran destruidas en su totalidad. Se ha identificado a la proteína LC, mediante la mutación y supresión inducida de residuos de cisteína, como responsable del fenotipo redondeado y el efecto citopático observado tras la infección por el FCV (41).

Este efecto citopático, visible tras la infección por el FCV, acontece a la par de cambios moleculares característicos de la apoptosis intrínseca, tales como la traslocación de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana celular, la condensación de la cromatina y la fragmentación del

DNA. Además, se ha observado el incremento en la actividad de las caspasas 3, 8 y 9, tras la salida de citocromo C de la mitocondria (60-61). Conjuntamente, se ha señalado la participación de las caspasas 2 y 6 en el procesamiento de la proteína de la cápside, generando un fragmento de 40 kDa del cual no se sabe su posible papel durante la infección (62). Esta apoptosis inducida por la infección, es la que permite la liberación y diseminación de las partículas virales en el hospedero.

Resulta evidente que la interacción entre los virus y las células que infectan se encuentra finamente regulada, desde la unión y entrada de las partículas infecciosas, hasta la salida de la progenie viral. En este proceso, la participación de las proteínas de la célula hospedera es indispensable. Es por ello que en nuestro laboratorio consideramos que es de suma importancia identificar qué factores celulares participan en la replicación de este patógeno. El identificar moléculas importantes en la replicación viral, permitirá generar información que pueda utilizarse para el control de la infección.

### **Antecedentes particulares**

Entre las estrategias utilizadas en el laboratorio para determinar cuáles proteínas celulares participan en la replicación del FCV, está la identificación de proteínas de asociadas al RNA viral y de expresión diferencial en extractos celulares infectados con el FCV, mediante geles de doble dimensión. Una de las manchas proteicas que presentó cambios en la intensidad de expresión y migración, se identificó por espectrometría de masas como anexina A2 (AnxA2) (Garrido G., tesis de maestría). Esta proteína ha sido aislada por múltiples investigadores que le han asignado variedad de nombres como p34, p36, p39, calpactina I de cadena pesada,

proteína I, cromobindina 8, lipocortina II y proteína IV anticoagulante placentaria (63).

### **La familia de las proteínas anexinas**

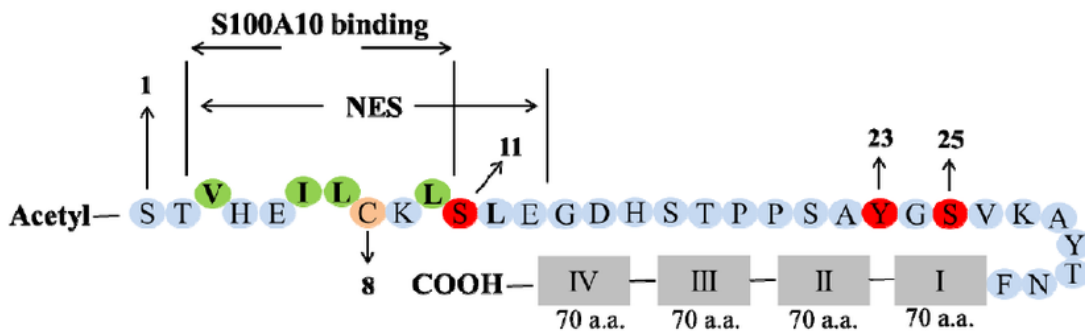
Las anexinas son una familia de proteínas que se unen a fosfolípidos cargados negativamente en membranas biológicas de una forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (64). Casi todas las anexinas son sustratos de PKCs tanto *in vitro* como *in vivo*, a excepción de Anexina V (65).

Los pesos moleculares de las anexinas oscilan entre los 30,000 y los 72,000 Daltones. Todas las anexinas poseen características estructurales comunes, entre las que destacan un dominio “core” conservado o COOH-terminal de cuatro repetidos, ocho en el caso de AnxA6, el cual contiene los sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y a fosfolípidos. Hacia el extremo N-terminal, poseen un segmento corto el cual es un sitio de modificación post-traducciona que es único para cada anexina, y que les confiere distintas propiedades y distribución intracelular (66). La expresión de diferentes miembros de la familia varía de acuerdo con el contexto celular (67).

Las anexinas están implicadas en el tráfico intracelular membranal, como la endocitosis; además, interactúan con proteínas del citoesqueleto, por lo cual podrían estar involucradas en la organización de este. Otras posibles funciones incluyen la proliferación y el crecimiento celular; participación en canales iónicos; receptor de superficie celular para la tenascina C y virus; regulación de la replicación del DNA; inhibición de la inflamación y coagulación de la sangre; regulación de la interacción de la matriz celular; y la adhesión célula-célula (66). La habilidad de algunas anexinas de mediar la agregación de vesículas dependientes de calcio *in vitro* sugiere que estas proteínas participan también en la endocitosis (67).

## AnxA2

La AnxA2 endógena existe como monómero soluble, con un peso molecular de 36 kDa, o formando un complejo heterotetramérico, comúnmente citada como A2t o p90; formado por un dímero de AnxA2 y otro de su ligando específico, la proteína S100A10, también llamada p11 (64). También se ha descrito la formación de un heterodímero compuesto por una subunidad simple de AnxA2 unida a una subunidad de 3-fosfoglicerato cinasa (68).



**FIGURA 4. ESTRUCTURA DE ANXA2.** AnxA2 está compuesta por dos dominios (amino terminal y carboxilo terminal). El dominio amino terminal posee los sitios para las modificaciones post-traduccionales (acetilación y fosforilación); además de un sitio de exporte nuclear (NES) y el sitio de unión a S100A10 (p11). Al otro extremo, el dominio carboxilo terminal incluye repetidos de 70 a.a. y contiene los sitios de unión a heparina,  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfolípidos, RNA y F-actina. Tomado de Bharadwaj et al., 2013.

AnxA2 posee un dominio N-terminal, el cual comprende los 32 primeros residuos de aminoácidos de la proteína, en donde se encuentran los sitios de fosforilación regulatorios tanto para proteína cinasa C (Ser-11 y Ser-25) como para la PP60<sup>c-src</sup> (Tyr<sup>23</sup>). Además de estos sitios de fosforilación, el dominio amino terminal contiene los residuos hidrofóbicos de interacción con S100A10 (Val-3, Ile-6, Leu-7 y Leu-10) y un sitio de exporte nuclear (NES). Por otra parte, el dominio “core” o COOH-terminal está compuesto por los



residuos remanentes, en donde se identifican cuatro repetidos conservados de 70 a.a. cada uno. En este dominio se localizan los sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfolípidos, f-actina y heparina (Fig. 4) (69-71).

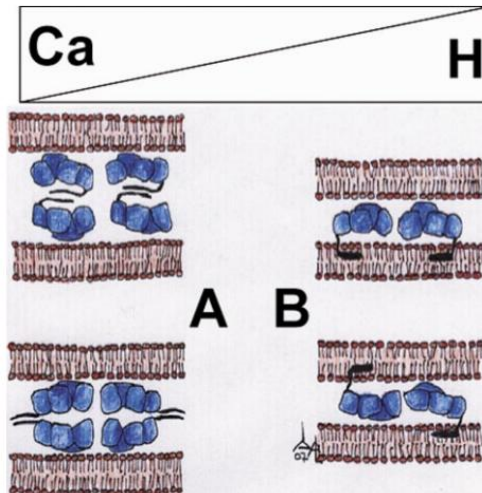
La distribución subcelular de AnxA2 está regulada por los niveles intracelulares de p11. Una alta concentración de p11 resulta en un incremento de AnxA2 heterotetramérica, la cual puede ser direccionada a la membrana plasmática lista para ser fosforilada y translocada. Por otro lado, al existir un exceso de p11, esta puede ser ubiquitinada y ser redireccionada al proteosoma y eliminada; disminuyendo así la concentración del ligando de AnxA2 para la formación del heterotetramero y determinando su presencia en la superficie celular (72).

### **AnxA2 y su unión a membranas**

Como monómero, se ha propuesto que AnxA2 puede participar en la unión entre membranas mediante dos mecanismos, uno mediado por  $\text{Ca}^{2+}$  y otro mediado por  $\text{H}^+$  (Fig. 5). En el mecanismo clásico mediado por  $\text{Ca}^{2+}$ , a un pH neutro, dos moléculas de AnxA2 interactúan a través de sus dominios N-terminal, sin que dichos dominios tengan contacto directo con la superficie de la membrana, permitiendo que la asociación con la membrana se lleve a cabo a través del COOH-terminal. En el segundo mecanismo, mediado por  $\text{H}^+$ , sólo participa una sola molécula de AnxA2, la cual interactúa por su dominio N-terminal con una membrana y por el dominio COOH-terminal con una segunda membrana (73).

Por su parte, A2t muestra una mayor flexibilidad al interactuar con membranas (Fig. 6). Se ha observado una conformación “estrecha” que se presenta en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , en la que la p11 se encuentra cercana a la

membrana y cuya estabilidad posiblemente se deba a la interacción del dominio N-terminal de la AnxA2 con la bicapa lipídica.

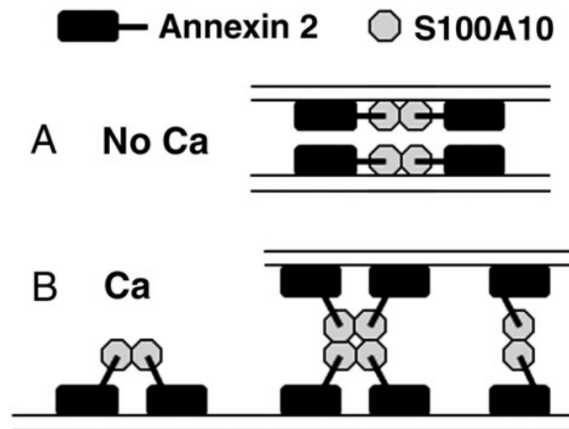


**FIGURA 5. MODELOS DE LOS PUENTES DE ANXA2.** Zibouche y colaboradores, proponen dos modelos sobre la forma en que AnxA2 monomérica participa como puente en la unión de membranas. A) Modo de organización clásica, dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ; y B) la dependiente de protones. Tomado de Zibouche et al., 2008.

Por otro lado, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , A2t puede adquirir una conformación “abierta”, en donde la p11 se encuentra alejada de la membrana y la interacción con la bicapa lipídica se lleva a cabo a través de la región COOH-terminal de la AnxA2 formando octámeros o estar en su forma clásica “cerrada” organizada como un heterotetrámero (74).

Es sabido que A2t induce la formación de dominios extensos ricos en  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ , colesterol y glicoesfingolípidos; y de igual modo se encuentra enriquecida en los sitios de interconexión entre membranas (75). La unión de la A2t a membranas aniónicas se produce por interacciones electrostáticas no específicas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , seguida por una difusión lateral de A2t sobre la superficie membranal para unirse específicamente a fosfatidilinositol (4,5) bifosfatos,  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ . A medida que las moléculas de A2t se agregan lateralmente en la superficie de la membrana, las moléculas de  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  unidas a A2t forman parches, lo que se ve favorecido por la presencia de colesterol en la membrana (76).

Se ha observado un incremento de hasta tres veces de la cantidad de AnxA2 presente en la parte externa de la membrana celular tras la inducción del estrés al modificar la temperatura, esta traslocación es independiente de la vía clásica (RE-Golgi) y no involucra la síntesis de proteína *de novo*. De igual modo, la exposición de células de retina de ratón 661W a concentraciones elevadas de glutamato induce el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, promoviendo la traslocación de la AnxA2 a la superficie celular (77). El traslado de AnxA2 hacia la superficie celular está ligado a su fosforilación en la Tyr<sup>23</sup> y a la presencia de p11 (78). Aunque también se ha sugerido que la interacción del A2t con componentes fosfolipídicos de la membrana promueve un cambio conformacional que promueve la accesibilidad a la Tyr<sup>23</sup> y que permiten su fosforilación por la PP60<sup>c-src</sup> (79).



**FIGURA 6. MODELOS DEL ARREGLO MOLECULAR DE A2T.** A) Sin calcio y con un pH ácido leve; B) en presencia de calcio, A2t puede adquirir una conformación "abierta" en la superficie de las membranas (izquierda), la subunidad S100A10 sobresale y está expuesta lejos de la bicapa de fosfolípidos. Al formar puentes de membrana, la proteína podría mantener la conformación "abierta" y formar octámeros (B, medio) u organizarse en la conformación clásica "cerrada" (B derecha) y permanecer en forma tetramérica. Tomado de Illien et al., 2010

Se ha observado un incremento de hasta tres veces de la cantidad de AnxA2 presente en la parte externa de la membrana celular tras la inducción del

estrés al modificar la temperatura, esta traslocación es independiente de la vía clásica (RE-Golgi) y no involucra la síntesis de proteína *de novo*. De igual modo, la exposición de células de retina de ratón 661W a concentraciones elevadas de glutamato induce el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, promoviendo la traslocación de la AnxA2 a la superficie celular (77). El traslado de AnxA2 hacia la superficie celular está ligado a su fosforilación en la Tyr<sup>23</sup> y a la presencia de p11 (78). Aunque también se ha sugerido que la interacción del A2t con componentes fosfolipídicos de la membrana promueve un cambio conformacional que promueve la accesibilidad a la Tyr<sup>23</sup> y que permiten su fosforilación por la PP60<sup>c-src</sup> (79).

La importancia de la presencia de AnxA2 en la superficie celular radica en que esta sirve como receptor para la proteína de matriz extracelular tenascina C (80); y que dada la interacción entre ambas proteínas, se promueven principalmente tres respuestas celulares, como son la pérdida de las adhesiones focales, incremento en la migración celular e incremento en la división celular (81).

Además, se sabe que A2t puede interaccionar de modo específico con el activador tisular del plasminógeno (tPA) y su sustrato Lys-plasminógeno (Lys-PLG) (82), facilitando la conversión de plasminógeno a plasmina (83); siendo la Cys9 presente en el dominio N-terminal de la AnxA2 esencial para la interacción tPA-AnxA2 (84).

Por otro lado, se considera que AnxA2 participa en la endocitosis mediada por clatrina. Las cubiertas endocíticas de clatrina, que tienen su origen en la membrana plasmática, contienen adaptadores AP2 que comprenden cuatro subunidades de adaptina ( $\alpha$ ,  $\beta_2$ ,  $\mu_2$  y  $\sigma_2$ ); AnxA2, al igual que AnxA1 y A6, posee el motivo Yxx $\phi$  (Y-Tyr<sup>23</sup>, X-residuo variable,  $\phi$ -residuo hidrofóbico pesado) que se considera promueve la interacción con la subunidad  $\mu_2$  del complejo de ensamble AP2 (85).

La evidencia de la participación del A2t en la endocitosis se obtuvo al disminuir la expresión de p11 y de AnxA2 mediante el uso de RNAdcs interferentes, lo que provocó la acumulación de endosomas reciclados en la región perinuclear que contenían transferrina (Tf), concluyendo que el complejo AnxA2/p11 participa en el posicionamiento intracelular de los endosomas reciclados (86). Sin embargo, estudios más recientes contradicen este hecho, al aseverar que la p11 no participa en el transporte endosomal junto con la AnxA2, ya que al purificar los endosomas tempranos, la primera no ha sido detectada e incluso al silenciar la expresión de la p11 la asociación de AnxA2 a los endosomas no se ve mermada (87).

La unión de AnxA2 a las membranas endosomales está finamente regulada por la presencia de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, AnxA2 no necesita la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  para poder unirse a endosomas tempranos; se ha observado que cuando se mutan los sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , presentes en el COOH-terminal de la AnxA2, esta continúa uniéndose a membranas endosomales, debido a que posee un sitio de interacción membranal en la región N-terminal, que le permite interactuar con membranas de una forma independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (88).

AnxA2 presenta un dominio de unión a F-actina, que comprende los 9 últimos amino ácidos (LLYLCGGDD) de la región COOH-terminal. La ubicación de este sitio de interacción resulta estratégica si se considera a la AnxA2 como vínculo entre membranas y citoesqueleto (89). Esta interacción está regulada por la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en la célula y confiere un papel esencial a la AnxA2 en mantener la plasticidad de la dinámica que existe entre la membrana celular y el citoesqueleto de actina (90-91).

AnxA2 ha sido aislada junto con la glicoproteína CD44; la cual está involucrada en interacciones célula-célula, adhesión celular y migración;

dentro de microdominios lipídicos resistentes a detergentes conocidos como balsas lipídicas, los cuales interaccionan con el citoesqueleto de actina. Se ha observado que AnxA2 promueve tanto el rearrreglo del citoesqueleto de actina como el agrupamiento de CD44 hacia las balsas lipídicas; además, se sabe que la interacción AnxA2-CD44 es dependiente de colesterol (92). Por otro lado, se ha descrito que la asociación de la AnxA2 hacia las balsas lipídicas depende de que el sitio de unión a p11 y los sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  estén intactos (93).

### **AnxA2 es una ribonucleoproteína**

En la búsqueda de proteínas que se asocian a AnxA2 mediante columnas de afinidad, se reveló la presencia de varias proteínas que se asocian a RNA. El estudio de estos complejos permitió establecer que AnxA2 es una proteína de unión a RNA que forma complejos ribonucleoproteicos (mRNP). Además, se identificó al RNAm del oncogene *c-myc* como componente de estos complejos, su participación dentro de ellos está dada por su interacción directa con AnxA2 (68). Posteriormente, se identificó que la interacción de AnxA2 con el RNAm de *c-myc* ocurre a través de la región 3'UTR, lo cual se corroboró mediante el uso de anticuerpos en ensayos de retardamiento, lo que provocó un retraso en la migración del complejo; además, al mutar en el RNAm de *c-myc*, el motivo de unión a AnxA2, se redujo la formación de dicho complejo. Se ha sugerido que la regulación en trans de AnxA2 sobre el 3'UTR del RNAm de *c-myc* afecta su localización perinuclear y su asociación con el citoesqueleto, lo cual también es dependiente de su estado de fosforilación (94).

Por otro lado, mediante ensayos de inmunoprecipitación y RT-PCR, se identificó que además del RNAm de *c-myc*, AnxA2 interacciona con su propio RNAm. Tras el uso de diferentes formas truncadas del RNAm de AnxA2, se

identificaron dos regiones de unión independientes, uno en la 3'UTR y otro posiblemente en la 5'UTR. Dentro de la 3'UTR se identificó una secuencia de 100 nucleótidos la cual cuenta con un motivo putativo de unión de cinco nucleótidos, 5'-AA(C/G)(A/U)G, que se repite en dos ocasiones a lo largo de esta secuencia. Dada la interacción con la 3'UTR y su posible interacción con la 5'UTR, nuevamente se sugiere que AnxA2 esté participando en la localización de RNAm específicos, así como en la represión de la traducción durante el transporte de los mismos (95). Así mismo, al mutar tres residuos presentes en el dominio IV de la región COOH-terminal de AnxA2, se determinó que el sitio de unión a RNAm se localiza en el dominio IV e involucra en las hélices C y D. Además, esta interacción es específica y dependiente de  $Ca^{2+}$  (96).

Por otra parte, se ha establecido que AnxA2, junto con el Factor de Empalme Asociado a PTB (PSF), interacciona con el Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES) del RNAm de p53 *in vitro* y *ex vivo*. Se sugiere que estas proteínas participan por separado, bajo diferentes condiciones fisiológicas y de estrés, en la traducción de este gen supresor tumoral (97).

## **AnxA2 y su participación en la replicación viral**

### **AnxA2 y entrada viral**

Se ha descrito la participación de la proteína AnxA2 durante diferentes pasos del proceso de infección de distintos virus. Entre los primeros reportes que asocian a la AnxA2 en las primeras etapas del ciclo replicativo viral, está el que indica que los viriones del citomegalovirus humano (HCMV) es capaz de unirse a esta proteína. En ensayos de adsorción por afinidad, se interaccionaron viriones de HCMV purificados con lisados de células endoteliales HUVEC radio marcadas superficialmente, lo que permitió

visualizar una proteína celular de 36 kDa, posteriormente identificada como AnxA2. Esta interacción específica se corroboró mediante ensayos de competencia entre AnxA2 marcada con  $^{125}\text{I}$  y AnxA2 no marcada, lo que disminuyó en poco más del 95% la interacción AnxA2-HCMV, evidenciando que la AnxA2 de superficie actúa como receptor para el HCMV (98). Aunado a lo anterior, se ha comprobado que AnxA2 se encuentra asociada a los fosfolípidos aniónicos presentes en la superficie de las partículas del HCMV, y que es adquirida durante la salida de las células infectadas (99). Sin embargo, dado que la unión de AnxA2 a fosfolípidos es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , se observó que, mediante el uso de quelantes, AnxA2 se disocia parcialmente de los virones de HCMV, sugiriendo la existencia de una interacción independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo cual, mediante ensayos de inmunoprecipitación y cromatografía de afinidad, se identificó que la glicoproteína B (gpUL55) (gB), principal componente de la envoltura viral, interacciona físicamente con AnxA2 (100).

Por otra parte, se ha establecido que durante la infección por el virus de la Influenza A (IAV) se requiere que el precursor hemaglutinina (HA), presente en la envoltura viral, sea cortado por proteasas tipo tripsina para generar las subunidades HA1 y HA2, y de este modo poder iniciar la infección. Además, se ha observado que la plasmina, cuyo precursor es el plasminogeno (PLG) y el cual es abundante en el plasma, posee actividad proteasa tipo tripsina que permite proveer un mecanismo alternativo para el corte de la HA. Se sabe que el PLG interacciona con la AnxA2 que se encuentra reclutada en la envoltura del virión a través del COOH-terminal, permitiendo la generación de plasmina y así iniciar la infección por el IAV; ya que al inhibir específicamente la interacción AnxA2-PLG, se demostró que PLG promueve la replicación del IAV mediante una vía dependiente de AnxA2.

Diversos ensayos han permitido concluir que la AnxA2 interacciona con la proteína de la cápside Vp1 del Enterovirus tipo 71 (EV71), agente causante



de la enfermedad de la boca-mano-pie, y que puede causar síntomas neurológicos fatales en niños. Tras el pretratamiento de células embrionarias humanas o de partículas virales, con anticuerpo anti-AnxA2 o con la rAnxA2, respectivamente, se observó la reducción de la adhesión viral a la célula hospedera. Además, la expresión de AnxA2 en células HepG2, las cuales no expresan esta proteína y no son permisivas a la infección por el EV71, permitió su infección y la obtención de partículas virales. Con lo anterior se demostró que la Vp1 del EV71 interacciona con la AnxA2 de la superficie, lo que potencia la entrada y la infectividad de este virus (101).

Por otro lado, se ha descrito que AnxA2 está involucrada en la unión/entrada del vesivirus del conejo, miembro de la familia *Caliciviridae*; mediante un ensayo de unión a proteína por superposición viral (VOPBA), se identificó a AnxA2 como uno de las proteínas que interaccionan con la cápside de este virus. La interacción se corroboró disminuyendo la expresión de la AnxA2 con siRNAs específicos o pretratando las células con anticuerpos anti-AnxA2, observando que en ambos se afectaba negativamente la infección por el RaV.

Asimismo, se ha observado que la señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; del inglés epidermal growth factor receptor) causada por la exposición de queratinocitos humanos al virus del Papiloma Humano tipo 16 (HPV16) provoca la activación de la cinasa de proteína Src, la cual actúa sobre la AnxA2 fosforilandola y promoviendo la traslocación de la forma heterotetramérica hacia la parte externa de la membrana plasmática; se sugiere que, la activación de esta cascada tiene la finalidad de permitir la unión de partículas virales y/o estimular el ensamble de endosomas en donde se sabe que AnxA2 es reclutada. Una vez en la superficie celular, el dominio “Core” de la AnxA2 es el encargado de interaccionar con el HPV16; sin embargo, no se descarta que dicha interacción se lleve a cabo de forma indirecta involucrando otros ligandos de AnxA2 como HSPGs, ligandos del

EGFR o el mismo EGFR (102). En contraparte, mediante ensayos de inmunoprecipitación y mutación, se ha identificado que la interacción entre la forma heterotetramérica y las partículas virales, se lleva a cabo a través de la región comprendida entre los aminoácidos 108–120 de la proteína minoritaria de la cápside L2 del HPV16 y la cadena ligera del heterotetramero de AnxA2, p11(103).

En diferentes estudios realizados con el virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (HIV-1), se ha observado que tras el uso de inhibidores de AnxA2 se logra mimetizar el mecanismo de inhibición del Inhibidor de Proteasa del Leucocito Secretor (SLPI), el cual tiene la habilidad de inhibir la infección del HIV-1 en macrófagos, lo que sugiere un sitio compartido de acción. Se propone que, después de que el HIV-1 se une a sus receptores canónicos, CD4 y CCR5, se lleva a cabo la fusión de la partícula con la membrana celular, posiblemente facilitada por la fosfatidilserina (PS) presente en la envoltura del virus y que es tomada de la membrana celular durante la salida viral; así, la PS de la envoltura interacciona con la AnxA2 que se encuentra en las balsas lipídicas de la membrana celular de los macrófagos, iniciando así una vía de fusión/entrada dependiente de AnxA2 que conduce a una infección productiva (104). Además, se sabe que la participación de la AnxA2 durante la infección por el HIV-1 en macrófagos se da en su forma monomérica, ya que el uso de un anticuerpo específico contra la región N-terminal bloquea la infección productiva, y no así cuando se usan drogas contra la forma heterotetramérica (105).

Más aún, se ha reportado la unión directa entre AnxA2 y la poliproteína Gag p55, precursora de las proteínas estructurales del HIV, y su colocalización con la CD63 en las membranas limitantes de los endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares. Se ha observado que la depleción de AnxA2 deriva en la disminución de la infectividad de los viriones liberados, el procesamiento incompleto de Gag p55 y la ineficiente incorporación de CD63 en los viriones;

lo que se sugiere que, AnxA2 está involucrada en la organización de las plataformas especializadas de ensamble de Gag p55 en las membranas endosomales de los macrófagos infectados (106). Sin embargo, otros estudios contradicen lo anterior, al no observar efecto en la expresión de Gag p55 al disminuir la expresión de AnxA2 en macrófagos derivados de monocitos, aunque no descartan su participación durante la infección viral (107).

### **AnxA2 y replicación viral**

Con respecto a la participación de la AnxA2 durante la etapa de replicación de algunos virus, se ha identificado que la oncoproteína E5, una de las tres oncoproteínas codificadas en el genoma del HPV16, se une al complejo A2t, relocalizándolo hacia la región perinuclear y sugiriendo su participación en la fusión membranal para la formación de las vacuolas coilocíticas, características de la infección por el HPV16 (108).

Tras la búsqueda de factores celulares capaces de unirse a estructuras de RNA monocatenario apareado, conocidas como “pseudonudos”, presentes en el genoma del virus de la bronquitis infecciosa (IBV) y que regulan la traducción de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) mediante un proceso de desfase del marco de lectura abierto; se puso en evidencia nuevamente la participación de AnxA2 en el metabolismo del RNA, al encontrar que este factor celular interacciona directamente con un “pseudonudo” presente en el IBV, influyendo negativamente en la eficiencia del desfase que regula la traducción de la RdRP y reduciendo la replicación de este virus (109).

Otro hallazgo relevante, fue la demostración de que AnxA2 forma parte los CR del virus de la Hepatitis C (HCV). Al aislar los CR del HCV y mediante

espectrometría de masas se identificó a AnxA2 como componente integral, logrando observar su colocalización con diferentes elementos virales como las proteínas no estructurales NS3, NS4B, NS5A, NS5B y el RNAdc. Además, se identificó al dominio III de la NS5A como el sitio de interacción a través del cual esta proteína NS interacciona con AnxA2 (110). Se ha corroborado que la presencia de AnxA2 promueve el enriquecimiento de las proteínas NS del HCV en las balsas lipídicas y se sugiere que esta interacción facilita el reclutamiento de varios fosfatidilinositidos hacia la membrana celular para generar los microambientes ricos en lípidos necesarios para la replicación viral (111).

### **AnxA2 y morfogénesis**

Por otro lado, existen evidencias de que AnxA2 participa en la formación de partículas virales; Sheng y colaboradores demostraron que, mediante el uso de siRNAs contra Anxa2 en células de riñón de cerdo, se afecta negativamente la producción de partículas del virus de la fiebre clásica porcina (CSFV), sin alterar la replicación del RNA. Más aún, se rebeló que existen tres aminoácidos en la proteasa polimerasa viral, NS5A, esenciales para la interacción con la AnxA2, cuya sustitución no afecta la replicación del RNA, pero de igual modo, reduce la producción de partículas virales; sugiriendo que la AnxA2 podría estar participando en la producción de partículas infecciosa del CSFV uniendo a la proteasa polimerasa, NS5A (112). Asimismo, la pérdida de la interacción AnxA2 con la proteína NS5 HCV afecta la formación de partículas virales infecciosas (110).

Estos antecedentes demuestran que AnxA2 es una proteína que participa en distintos eventos de la replicación de virus diversos, que involucran su interacción con elementos de las membranas celulares.

## **Antecedentes directos**

Antecedentes directos de nuestro laboratorio han demostrado que la AnxA2 se encuentra reclutada en los complejos de replicación virales de células CrFK infectadas con el FCV. Así mismo, se determinó mediante ensayos de inmunoprecipitación a partir de células infectadas, que AnxA2 se encuentra asociada con el RNA viral, lo cual sugiere fuertemente que esta proteína podría participar en el ciclo replicativo del FCV. Más aun, durante mi trabajo de maestría, se realizaron ensayos preliminares de interferencia de AnxA2, mediante la técnica de siRNA. Las células interferidas e infectadas, presentaron una reducción de la presencia de virus en el sobrenadante de estas células, comparado con el de las células interferidas con un siRNA-ctrl, sugiriendo la participación de AnxA2 en la replicación del FCV. Dada la presencia de AnxA2 en los complejos de replicación, es posible que participe en procesos como la traducción y que como en el virus HCV, tenga también un papel en su formación.

## **Justificación**

Las proteínas celulares juegan un papel primordial en las diferentes etapas de la replicación viral. Un ejemplo de ello es la AnxA2, la cual participa en distintas etapas de diversos virus. Antecedentes en el laboratorio sugieren que AnxA2 participa en la replicación del FCV. El confirmar la participación de esta proteína en la replicación del FCV y determinar en qué fase específica del ciclo viral actúa, generará información acerca de los requerimientos de este virus para su multiplicación exitosa. El conocer las moléculas de las que depende FCV para su replicación permitirá el desarrollo de estrategias para su control y prevención.

## **Hipótesis**

La proteína celular AnxA2 está implicada en la replicación del FCV, específicamente en la formación de los complejos de replicación.

## **Objetivo general**

Elucidar si AnxA2 participa en el ciclo replicativo del FCV y determinar alguna de sus funciones durante la replicación viral.



## **Objetivos particulares**

1. Corroborar que la proteína AnxA2 participa en la replicación del FCV.
2. Definir los niveles de expresión y la localización subcelular de la AnxA2 durante la infección por el FCV.
3. Analizar si AnxA2 se localiza en los CR.
4. Determinar si AnxA2 participa en la formación de los complejos de replicación.

## **Materiales y métodos**

### **Propagación y mantenimiento de célula CrFK**

Células CrFK (Crandell-Rees Feline Kidney, ATCC® CCL-94™) se crecieron y mantuvieron en Medio mínimo esencial avanzado (MEM-Advanced, GIBCO® Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO® Thermo Fisher Scientific) y antibióticos (10,000 U/μg/ml de mezcla de penicilina-estreptomicina, Invitrogen), a 37°C en una atmósfera con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las monocapas celulares alcanzaron el 80% de confluencia se subcultivaron utilizando tripsina al 1% (GIBCO® Thermo Fisher Scientific).

### **Infección y propagación del FCV**

Monocapas de células CrFK confluentes se infectaron con el FCV cepa F9 (Feline calicivirus, ATCC® VR782™) a diferente multiplicidad de infección (MOI) según se indica. La adsorción del virus se llevó a cabo en medio MEM-Advanced, libre de suero, durante 60 min, a 37°C, en 5% de CO<sub>2</sub> y con movimiento a intervalos de 15 min. Posteriormente, se retiró el medio y se añadió medio MEM-Advanced adicionado con 2% de SFB. Se incubaron a

37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>, recolectando las células a los tiempos establecidos para cada experimento.

Para la propagación del virus, las células se infectaron a una MOI de 0.1 permitiendo que la infección continuara hasta obtener un efecto citopático visible por microscopía óptica. Posteriormente, las células se congelaron y descongelaron en tres ocasiones, para romper las membranas celulares y liberar los virus en el sobrenadante, este se almacenó en alícuotas de diferentes volúmenes a -80°C. El título viral se determinó por ensayos de plaqueo.

### **Electroforesis en geles de doble dimensión (2D)**

Se utilizaron 500 µg de extractos totales de proteínas, las muestras se diluyeron en buffer de rehidratación (8 M urea, 0.5% (w/v) CHAPS, 10 mM DTT, 0.001% azul de bromofeno y Bio-Lyte 3/10 Ampholyte). El enfoque isoeléctrico se realizó usando tiras de 19 cm con un gradiente de pH de 3-10 (GE Healthcare Pharmalyte TM, Cat. No.: 170,456-01), durante 24 h a 22 ° C (PROTEAN IEF cell System; Bio-Rad, Cat. No. 165–4000). Para la segunda dimensión, las tiras se montaron en una SDS-PAGE de 10 % de 19 x 23 cm, se corrieron a 250 V durante 24 ha 22 ° C. Finalmente los geles en 2D se tiñeron con plata (Bio-Rad, Cat. No. 161–0449), para su escisión y posterior envío para identificación por masas.

### **Interferencia del RNAm de AnxA2 mediante el uso de siRNAs**

Para la interferencia del RNAm de AnxA2 se utilizaron los siRNAs diseñados y probados durante el proyecto de tesis de maestría (113). Las dos secuencias utilizadas se muestran a continuación:

siRNA 1:

5' CCGCAGCAAUGAACAGAGAUU '3

5' UCUCUGUUCAUUGCUGCGGUU '3

siRNA 2:

5' AACACCUUGCUCAGUAUGAUUU '3

5' AUCAUACUGAGCAGGUGUUUU '3

La transfección se realizó utilizando el agente transfectante siPORT (siPORT™ Amine transfection Agent, Ambion®) como se describe a continuación: en una multiplaca de seis pozos, se sembraron  $3 \times 10^5$  células CrFK y se mantuvieron en medio MEM-Advanced suplementado con SFB al 10%, durante 24 h antes de la transfección. Pasado este tiempo, se mezclaron en microtubos, 100  $\mu$ L de medio reducido en suero Opti-MEM (Opti-MEM™, Gibco™) y 5  $\mu$ L de siPORT, por cada pozo. Al mismo tiempo, por separado, se mezclaron 100  $\mu$ L de medio Opti-MEM y el siRNAs-ctrl (sc-37007, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) o los diseñados contra AnxA2 a una concentración final de 200 nM para 1 mL. Las mezclas se incubaron por 10 min a temperatura ambiente (TA). Pasado este tiempo, ambas soluciones se pasaron a un solo tubo y se incubaron por 10 min a TA. Posteriormente, se adicionaron 800  $\mu$ L de medio Opti-MEM a cada tubo y se incubaron por 10 min. Paralelamente, las células se lavaron en dos ocasiones con 500  $\mu$ l de medio Opti-MEM, para luego adicionarles el volumen total de las soluciones que contenían el siRNA irrelevante o el dirigido contra AnxA2, preparadas previamente. La células se incubaron por 8 h a 37°C y con 5 % de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se agregó un volumen similar de medio MEM-Advanced suplementado con 10% de SFB a cada pozo, dejando incubar bajo las mismas condiciones durante 72 h.

## **Ensayo de viabilidad en células interferidas**

Monocapas de células CrFK cultivadas en placas de 96 pozos, se transfectaron con los siRNAs dirigidos contra AnxA2 o el siRNA irrelevante a una concentración de 200 nM. La viabilidad celular se midió a las 8 h (tiempo en que se les añade el medio MEM-Advanced suplementado con 10% de SFB) y a las 72 h post transfección (tiempo de incubación) con el Kit CellTiter 96® AQueous (Promega) bajo las especificaciones del proveedor, a una absorbancia de 590 nm en un lector BioTek.

## **Extractos celulares totales**

A monocapas de células CrFK confluentes no infectadas e infectadas se les retiró el medio y se lavaron en tres ocasiones con PBS. Tras el último lavado se agregó PBS suficiente para levantar la monocapa con la ayuda de un gendarme, las células suspendidas se transfirieron a un microtubo y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y a la pastilla se agregaron 500 µL de buffer RIPA (0.5 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP40), adicionado con coctel inhibidor de proteinasas al 1X (Complete™, Roche), por cada  $2 \times 10^7$  células. Las muestras se mantuvieron a 4°C durante 30 min, mezclando vigorosamente en vortex cada 10 min durante 30 s. Pasado este tiempo, el lisado celular se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante, que contenía las proteínas celulares, se pasó a un nuevo microtubo y la pastilla se desehechó. Finalmente, las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro SmartSpec™ y se almacenaron en alícuotas de 50 ng a -80 °C.

## **Cuantificación del FCV mediante ensayos de plaqueo**

Monocapas de células CrFK confluentes, sembradas en multiplacas de 12 pozos, se infectaron con diluciones seriadas, logarítmicas con base 10 del virus en medio MEM-Advanced sin suero. La adsorción del virus se llevó a cabo durante 1 h a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> y con movimiento a intervalos de 15 min, para posteriormente ser retirado. A cada pozo se le adicionaron 300 µL de carboximetilcelulosa al 2%, diluida en medio MEM-Advanced adicionado con SFB al 2%. Las cajas se incubaron a 37°C por 48 h, con 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se retiró la carboximetilcelulosa y se adicionaron 300 µL de formaldehído al 3.7% en PBS durante 15 min. Se retiró el formaldehído y se adicionaron 300 µL de cristal violeta (0.1 g de cristal violeta, 29.9 ml de etanol absoluto y 70 ml de agua bidestilada estéril) por 10 min. Se lavaron las placas y finalmente se secaron para su conteo.

## **Ensayos tipo Western Blot**

Extractos totales de células con los distintos tratamientos (50 ng por muestra), se les añadió amortiguador de muestra para proteínas (0.125 M Tris 0.5 M pH 6.8, 2.5% SDS al 10%, 2.5% 2-mercaptoetanol, 2.5% glicerol, 0.1 mg/mL azul de bromofenol) y se hirvieron por 10 min, para luego someterlas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, a 120 V por 1 h. Posteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en un aparato de transferencia semi-seca a 12 Volts, por 45 min. La eficiencia de la transferencia se verificó tiñendo la membrana con una solución de rojo de Ponceau (Ponceau 0.01%, ácido acético 0.1%). Una vez corroborado que la transferencia de proteínas fue eficiente, la membrana se bloqueó con 10 ml de TBS Tween-20 al 0.05% (Trisma base 100 M pH 8, NaCl 1.5 mM) y leche descremada al 5% durante 2 h, a TA. Después se lavó con TBS Tween-20 y

se adicionó el anticuerpo primario deseado diluido en TBS Tween-20, dejándolo en incubación toda la noche a 4°C en movimiento constante.

Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó tres veces, por 10 min cada vez, con TBS Tween-20 y se adicionó el anticuerpo secundario correspondiente, diluido según se requería e incubando a TA por 2 h. La membrana se lavó tres veces y se reveló con el Kit SuperSignal West Femto (Pierce).

### **Detección de AnxA2 de superficie celular por ensayos con biotina**

Células CrFK crecidas en monocapa ( $1 \times 10^7$ ) se lavaron con búfer PBS frío (adicionado con 0.1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y 1 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ ). Para posteriormente ser incubadas con 1 mg/mL de Succinimidil-6-(biotinamido) hexanoato (Pierce) en PBS, a 4°C por 2 h en agitación suave constante. Se realizaron tres lavados de 2 min a 4°C con PBS adicionado con glicina (100 mM). Después las células se lisaron con el bufer de lisado que contenía 1% de TritonX-100, 0.05% de deoxicolato de sodio, 5 mM de EDTA, 30 mM de Tris-HCl (pH7.4), 150 mM de NaCl, adicionado con inhibidores de proteasa (complete mini Roche) y 10% de glicerol. El lisado se centrifugo a 15,000 g durante 5 min. Se utilizaron 3 mg de proteína del sobrenadante para interaccionarlos con 1 mL de agarosa-streptavidina (Pierce), pre-equilibrada con buffer de lisis. La mezcla fue incubada durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Las perlas se lavaron en cinco ocasiones con buffer de lisis para remover las proteínas que no interaccionaron. Las interacciones agarosa-streptavidina-biotina fueron solubilizadas con búfer de proteínas Laemmli, hervidas durante 10 min y sujetas a SDS-PAGE al 10%. La presencia de AnxA2 en las proteínas solubilizadas del complejo se corroboró mediante la inmunodetección con un anticuerpo anti-AnxA2 específico. La detección de la

proteína hnRNPA1 solo en el input indica que no hubo contaminación de proteínas citoplásmicas.

### **Ensayos tipo VOPBA**

Segmentos de membrana de nitrocelulosa con proteínas totales de células CrFK sin infectar se bloquearon durante 1 h en solución TBS que contenía 1% de leche en movimiento constante, seguida de tres lavados de 5 min con TBS. Las membranas se incubaron durante la noche con viriones de FCV ( $10^{10}$  u.f.p. / ml) diluidas 1: 5 en TBS con 1% de leche. Tras el tiempo establecido, se realizaron tres lavados con TBS-Tween al 0,1%. Las membranas se incubaron durante 2 h a TA con anticuerpo anti-FCV (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluido en TBS-Tween al 0.1%, seguido de tres lavados. Para los ensayos de inhibición, se incubó la membrana con un anticuerpo anti-AnxA2 específico. Las membranas se incubaron con peroxidasa y visualizadas por quimioluminiscencia.

### **Ensayos de Inmunofluorescencia**

Células CrFK ( $1.5 \times 10^5$ ) se crecieron en placas de seis posos sobre cubreobjetos pretatados con polo-L-lisina (0.1%). Los cubreobjetos con las células tratadas se lavaron durante 5 min con buffer de citoesqueleto CB (10 mM MES [ácido 2-morfolino etano], 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM  $MgCl_2$ , y 5 mM glucosa). Después, se trataron con buffer CB adicionado con 4% de paraformaldehído y 0.5% de Tritón X-100 durante 5 min a TA. Tras tres lavados con PBS, las células se incubaron con 2 ng/ $\mu$ L del anticuerpo primario correspondiente dejándolo incubar durante toda la noche a 4°C, para luego ser lavarlas en tres ocasiones con PBS. Posteriormente, las células se incubaron durante 45 min a TA con el anticuerpo secundario



correspondiente; y lavadas en tres ocasiones con PBS. Las células se incubaron con el segundo anticuerpo primario deseado, 2 ng/μL, a 4°C durante toda la noche; y nuevamente lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente durante 45 min a TA. Tras tres lavados con PBS, las células se incubaron con 1μg/μL de 4',6'-diamidino- 2-fenilindol (DAPI) por 2 min; lavadas en seis ocasiones con PBS y tres veces con agua destilada. Finalmente, las células se montaron sobre portaobjetos utilizando Vectashield (Vector Laboratories). Las muestras se observaron mediante microscopía confocal.

### **Aislamiento de los CR**

Para el aislamiento de los CR se siguió el protocolo descrito previamente por Green y colaboradores (59). Brevemente, monocapa de células CrFK no infectadas (mock) e infectadas con el FCV a una M.O.I. de 10. Tras 5 h, las monocapas se levantaron con un gendarme y se transfirieron a tubos cónicos, para su centrifugación a 300 x g por 5 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 1 mL de buffer TN frío (10 mM Tris [pH 7.8], 10 mM NaCl). Tras 15 min en hielo, las células se lisaron dando 60 golpes en un homogenizador manual. El lisado se transfirió a un microtubo de 1.5 ml y sujeto a centrifugación por 5 min a 900 x g a 4°C. El sobrenadante se transfirió un tubo nuevo para volver a centrifugar durante 20 min a 20,800 x g a 4°C. La pastilla resultante, que contiene los CR, se resuspendió nuevamente en buffer TN con 15 % de glicerol y guardada a -70°C.

### **Ensayos de Inmunoprecipitación**

Extractos de células CrFK (250 ng/μL) se preaclaron incubando con 10 μL de perlas con proteína agarosa-G (Roche) durante 2 h a 4 °C, para

posteriormente centrifugar a 13,000 x g por 5 min. El sobrenadante resultante se incubo con anticuerpo anti-GFP o anti-AnxA2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Los complejos formados se inmovilizaron con perlas de proteína agarosa-G, previamente saturadas con 2% de BSA, durante 2 h a 4°C. Las perlas se lavaron cinco veces con buffer NETS (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 5 mM EDTA, 1 mM ditioneitol [DTT], 100 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-40). Los complejos unidos a las perlas se sometieron a RT-PCR o se analizados por ensayos tipo WB.

### **Análisis de cambio de movilidad electroforética (EMSA)**

Extractos de células CrFK se trataron con 5 µg/ml de anticuerpo no relaciona o de anti-AnxA2 durante 15 min a 4°C, previo o tras adicionar el transcrito de RNA correspondiente a la RT 5' y 3' del FCV radio marcado con [ $\alpha^{32}$ P]-UTP ( $4 \times 10^5$  cpm), y se dejaron interaccionar durante 15 min a 4°C. Posteriormente las mezclas se incubaron con 20 unidades de RNasa A y 20 µg de RNasa T1 por 15 min a TA. Los complejos formados se corrieron en geles nativos al 8%; para luego ser deshidratados y revelados por auto radiografía.

### **Microscopia electrónica**

Células CrFK, interferidas e infectadas, se fijaron con 2.5 % (v/v) de glutaraldehido en de buffer cacodilato de sodio (0.1 M, pH7.2) por 60 min, para posteriormente ser fijadas con 1 % (m/v) de tetróxido de osmio en el mismo buffer. Tras la deshidratación con concentraciones crecientes de etanol y óxido de propileno, las muestras se sumergieron en resina epoxi Poly/Bed<sup>®</sup> a 60 °C por 24 h. Se obtuvieron secciones delgadas (60 nm) y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su examinación en un

microscopio electrónico de transmisión Joel JEM-1011. Para el inmunomarcaje con oro las muestras se fijaron con 4 % de PFA y 0.5 % de glutaraldehído en PBS durante 1 h a TA. Las muestras se sumergieron en resina LR WHITE (London Resin Co.) y polimerizadas bajo luz UV a 4°C durante toda la noche. Secciones delgadas se incubaron con anticuerpos anti-AnxA2 (ratón; sin diluir) o anti-RNAdc (ratón; 1:60), para después ser incubadas con anticuerpos anti-IgG-ratón conjugadas con partículas de oro de 20 nm (Ted Pella Inc; 1:60).

## **Resultados**

Los virus al ser parásitos intracelulares estrictos, ocupan la maquinaria celular para llevar a cabo todos los procesos necesarios para su multiplicación. Es por ello que se han descrito una gran cantidad de proteína celulares implicadas en su replicación.

Ensayos preliminares desarrollados durante mi proyecto de maestría, sugieren que la interferencia de AnxA2 resulta en una disminución de partículas del FCV en el sobrenadante de las células infectadas, sugiriendo que esta proteína es necesaria para una replicación eficiente del FCV.

Para corroborar la participación de la proteína celular AnxA2 en la replicación del FCV, se realizaron nuevamente los ensayos de silenciamiento de esta proteína mediante el uso de siRNAs específicos, diseñados y utilizados durante el proyecto de tesis de maestría. Brevemente se recapitula el proceso de diseño de los RNAs interferentes.

Al momento de la realización de estas tesis no se contaba con la secuencia completa del genoma del *Felis catus*; y por lo tanto, no se contaba con la secuencia del gene que codifica para la AnxA2; por lo cual, se realizó un alineamiento con las secuencias encontradas en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dichas secuencias, pertenecientes a diferentes mamíferos, sirvieron como base para el diseño de un par de oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar la región carboxilo de la AnxA2 de felino y que posteriormente se secuenció. La correspondencia de la secuencia del amplicón obtenido se corroboró mediante un alineamiento utilizando el sitio en línea Biology Workbench (<http://workbench.sdsc.edu/>), quedando comprobada la homología de la secuencia de la AnxA2 de felino obtenida (Fig. 1).

Una vez conocida la secuencia del cDNA del gene de la AnxA2, esta se utilizó como base para el diseño de dos pares de siRNAs, utilizando tres softwares (disponibles en línea) específicos para tal propósito:

[https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/DSIRNA\\_CUSTOM](https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/DSIRNA_CUSTOM)

<https://www.thermofisher.com/mx>

<http://i.cs.hku.hk/~sirna/software/sirna.php>

De las diferentes opciones arrojadas por estas herramientas en línea se eligieron dos, con base en la frecuencia que estas eran sugeridas. Las cuales se mandaron a sintetizar (Applied Biosystems, México).

**siRNA 1:**

**5'-CCGCAGCAAUGAACAGAGAUU-3'**

**5'-UCUCUGUUCAUUGCUGCGGUU-3'**

**siRNA 2:**

**5'-AACACCGUCUCAGUAUGAUUU-3'**

**5'-AUCAUACUGAGCAGGUGUUUU-3'**

(\*) Clustalw cuts off Fasta labels after the first space (e.g. ">abc def" becomes ">abc").

## Sequence alignment

Consensus key (see documentation for details)

- \* - single, fully conserved residue
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

ANXA2_Felino      -----TTGGAGGGTGGATCACTCCACTCCCCCA
Bos_taurus_      ATGAAATTCCTGTGCAAGCTCAGCTTGGAGGGTGGATCACTCCACTCCCA
Homo_sapiens_    ACGAAATCCTGTGCAAGCTCAGCTTGGAGGGTGGATCACTCCACTCCCA
Canis_lupus_familiaris_ ACGAAATTCCTGTGCAAGCTCAGCTTGGAGGGTGGATCACTCCACTCCCA
Mus_musculus_   ACGAAATCCTGTGCAAGCTCAGCTTGGAGGGTGGATCACTCCACTCCCA
Rattus_norvegicus_ ACGAAATCCTGTGCAAGCTCAGCTTGGAGGGTGGATCACTCCACTCCCA
***** ** * * *

ANXA2_Felino      AGCGCATACGGGTCGGTCAAAAGCATACACCAATTTTGATGCTGAGCGTGA
Bos_taurus_      AGTGCATACGGGTCAGTCAAAAGCATACACTAATTTTGATGCTGAGCGGGA
Homo_sapiens_    AGTGCATATGGGTCGTCAAAAGCCTATACTAATTTTGATGCTGAGCGGGA
Canis_lupus_familiaris_ AGTGCATACGGGTCGGTCAAAAGCATACACTAATTTTGATGCTGAGCGTGA
Mus_musculus_   AGTGCATACGGGTCAGTCAAAAGCCTACACCAACTTCGATGCTGAGAGGGA
Rattus_norvegicus_ AGTGCATATGGGTCGGTCAAAAGCCTACACCAACTTCGAGCTGAGAGGGA
** * * * ** * * * ** * * * ** * * * ** * * *

ANXA2_Felino      TGCTCTGAACATTGAAACGGCCATCAAGACCAAAAGGTGTGGATGAGGTCA
Bos_taurus_      TGCTCTGAACATTGAAACAGCCATCAAGACCAAAAGGTGTGGATGAGGTCA
Homo_sapiens_    TGCTCTGAACATTGAAACAGCCATCAAGACCAAAAGGTGTGGATGAGGTCA
Canis_lupus_familiaris_ TGCTCTGAACATTGAAACGGCCATCAAGACCAAAAGGTGTGGATGAGGTCA
Mus_musculus_   TGCTCTGAACATTGAAACAGCCATCAAGACCAAAAGGTGTGGATGAGGTCA
Rattus_norvegicus_ TGCTCTGAACATTGAAACAGCCATCAAGACCAAAAGGTGTGGATGAGGTCA
**** * * * * *

ANXA2_Felino      CCATCGTCAACATTTGACCAACCCGAGCAATGACAGAGACAGGATATT
Bos_taurus_      CCATCGTCAACATCGTCAACATTTGACCAACCCGAGCAATGACAGAGACAGGATATT
Homo_sapiens_    CCATTTGCAACATTTGACCAACCCGAGCAATGACAGAGACAGGATATT
Canis_lupus_familiaris_ CCATTTGCAACATTTGACCAACCCGAGCAATGACAGAGACAGGATATT
Mus_musculus_   CCATTTGCAACATCGTCAACATTTGACCAACCCGAGCAATGACAGAGACAGGATATT
Rattus_norvegicus_ CCATTTGCAACATTTGACTAACCAGCAATGACAGAGACAGGATATT
**** * * * * *

ANXA2_Felino      GCCTTCGCTACAGAGAGGACCAAAAGGAACTTGCATCAGCACTGAA
Bos_taurus_      GCCTTCGCTACAGAGAGGACCAAGAGGAACTTGCATCAGCACTGAA
Homo_sapiens_    GCCTTCGCTACAGAGAGGACCAAAAGGAACTTGCATCAGCACTGAA
Canis_lupus_familiaris_ GCCTTCGCTACAGAGAGGACCAAAAGGAACTTGCATCAGCACTGAA
Mus_musculus_   GCCTTCGCTACAGAGAGGACCAAAAGGAACTTGCATCAGCACTGAA
Rattus_norvegicus_ GCCTTCGCTACAGAGAGGACCAAAAGGAACTTGCATCAGCACTGAA
***** ** * * *

ANXA2_Felino      GTCAGCCTTGTCTGGCCACTGGAGACCGTGATTTTGGCCCTTTGAAA
Bos_taurus_      GTCAGCCTTGTCTGGCCACTGGAGACCGTGATTTTGGCCCTTTGAAA
Homo_sapiens_    GTCAGCCTTGTCTGGCCACTGGAGACCGTGATTTTGGCCCTTTGAAA
Canis_lupus_familiaris_ GTCAGCCTTGTCTGGCCACTGGAGACCGTGATTTTGGCCCTTTGAAA
Mus_musculus_   GTCAGCCTTGTCTGGCCACTGGAGACCGTGATTTTGGCCCTTTGAAA
Rattus_norvegicus_ GTCAGCCTTGTCTGGTCACTGGAGACCGTGATTTTGGCCCTTTGAAA
*** * * * *

ANXA2_Felino      CACCTGCTCAGTATGATGCTTCTGAGCTGAAAGCCTCCATGAAGGGGCTG
Bos_taurus_      CACCTGCTCAGTATGATGCTTCTGAGCTGAAAGCCTCCATGAAGGGGCTG
Homo_sapiens_    CACCTGCTCAGTATGATGCTTCTGAGCTGAAAGCCTCCATGAAGGGGCTG
Canis_lupus_familiaris_ CACCTGCTCAGTATGATGCTTCTGAGCTGAAAGCCTCCATGAAGGGGCTG
Mus_musculus_   CACCTGCCAGTATGATGCTTGGAACTGAAAGCCTCCATGAAGGGGCTG
Rattus_norvegicus_ CACCTGCTCAGTATGATGCTTCTGAGCTGAAAGCCTCCATGAAGGGGCTG
***** ** * * *

ANXA2_Felino      CACCTGCTCAGTATGATGCTTCTGAGCTGAAAGCCTCCATGAAGGGGCTG
Bos_taurus_      CACCTGCTCAGTATGATGCTTCTGAGCTGAAAGCCTCCATGAAGGGGCTG
Homo_sapiens_    CACCTGCTCAGTATGATGCTTCTGAGCTGAAAGCCTCCATGAAGGGGCTG
Canis_lupus_familiaris_ CACCTGCTCAGTATGATGCTTCTGAGCTGAAAGCCTCCATGAAGGGGCTG
Mus_musculus_   CACCTGCCAGTATGATGCTTGGAACTGAAAGCCTCCATGAAGGGGCTG
Rattus_norvegicus_ CACCTGCTCAGTATGATGCTTCTGAGCTGAAAGCCTCCATGAAGGGGCTG
***** ** * * *

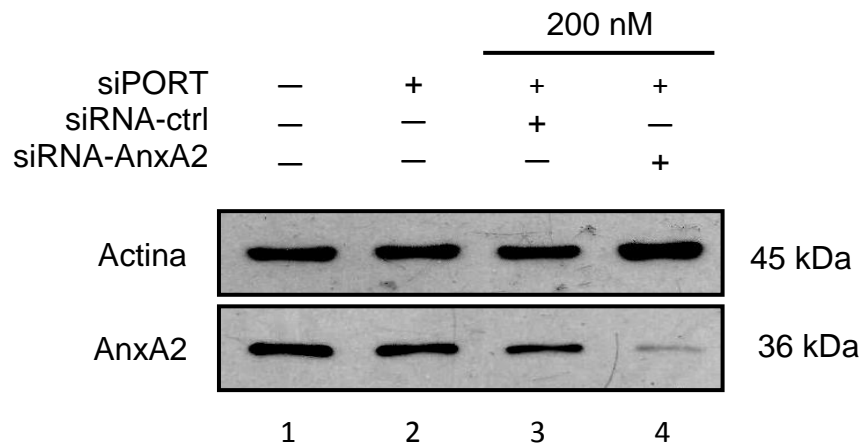
ANXA2_Felino      GGGACTGATGAGGACTCCCTCAITGAGA-----
Bos_taurus_      GGGACTGATGAGGACTCTCTCAITGAGATCATCTGCTCAAGGACCAACCA
Homo_sapiens_    GGAACCGAGGAGACTCTCTCAITGAGATCATCTGCTCAAGGACCAACCA
Canis_lupus_familiaris_ GGGACTGATGAGGACTCCCTCAITGAGATCATCTGCTCAAGGACCAACCA
Mus_musculus_   GGGACTGATGAGGACTCCCTCAITGAGATCATCTGCTCAAGGACCAACCA
Rattus_norvegicus_ GGGACTGATGAGGACTCCCTCAITGAGATCATCTGCTCAAGGACCAACCA
** * * * ** * * *

```

FIGURA 7. ALINEAMIENTO DEL AMPLICÓN CON LAS SECUENCIAS CORRESPONDIENTES A LA ANXA2 DE OTROS MAMÍFEROS. El alineamiento se realizó utilizando el programa de dominio público The Biology WorkBench (disponible en la red). En los recuadros se encierran los sitios con mayor homología.

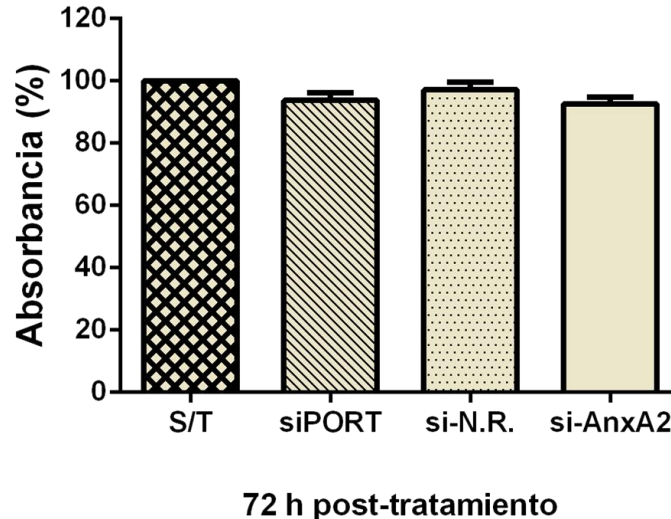
## La interferencia de AnxA2 modifica la producción de proteínas virales y de partículas virales en el sobrenadante de las células infectadas

Para confirmar que AnxA2 participa en la replicación del FCV, se realizaron nuevamente ensayos de interferencia de AnxA2 y se determinó su efecto en la producción de partículas virales. Para ello, células CrFK se transfectaron con 200 nM de siRNAs contra el RNAm de AnxA2 (de aquí en adelante referidos como siRNA-AnxA2), o siRNAs irrelevantes, sin capacidad de unirse y degradar a ningún RNA celular (de aquí en adelante referidos como siRNA-ctrl), por 72 h; posteriormente se obtuvieron extractos protéicos; la presencia de AnxA2 se analizó mediante ensayos tipo WB (Fig. 8). Los extractos de las células interferidas con el siRNA-ctrl (Fig. 8; carril 3), presentaron un nivel de proteína AnxA2, semejante al observado en las células sin tratar (S/T) o tratadas con el agente transfectante (siPORT) (Fig. 8; carriles 1 y 2, respectivamente). Sin embargo, en los extractos de células interferidas con los siRNA-AnxA2, se observó la reducción de hasta un 93 % en la expresión de AnxA2 (Fig. 8; carril 4).



**FIGURA 8. INTERFERENCIA DE LA EXPRESIÓN DE ANXA2.** Extractos proteicos obtenidos de células CrFK sin tratamiento (S/T), tratadas con el transfectante (siPORT), con el siRNA-ctrl y con los siRNA-AnxA2, en una concentración de 200  $\mu$ M a 72 h de incubación se sometieron a PAGE-SDS, transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con ab anti-AnxA2 y anti-actina, como control de carga, y un ab secundario acoplado a peroxidasa. La imagen corresponde a un experimento representativo de tres ensayos independientes.

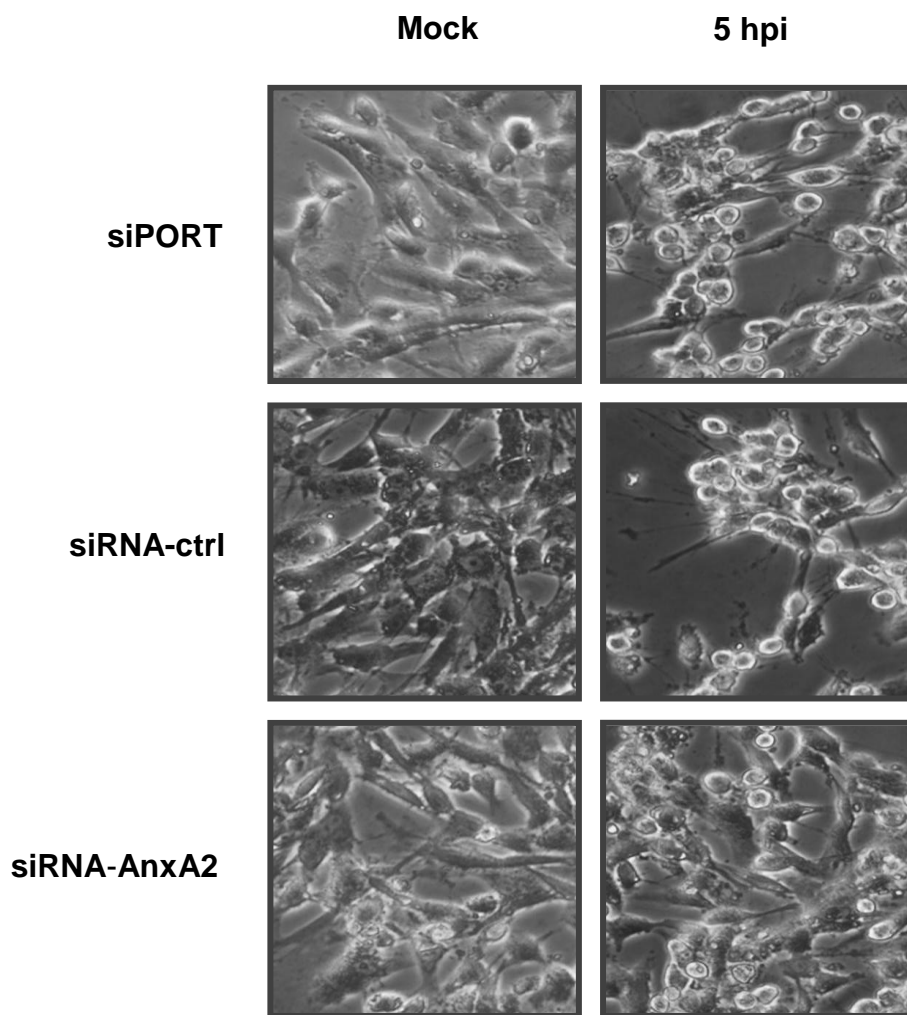
Dado que la AnxA2 es una proteína involucrada en múltiples funciones importantes para la célula, por lo que se realizó un ensayo de viabilidad de las células transfectadas con los siRNAs-AnxA2 (Fig. 9). Para ello, monocapas de células CrFK se cultivaron en placas de 96 y se transfectaron con los siRNAs-AnxA2, así como el siRNA-ctrl a una concentración final de 200 nM. Además, se incluyeron células tratadas con el transfectante siPORT (siPORT) y células sin tratamiento (S/T). Las lecturas espectrofotométricas de las células tratadas, bajo las diferentes condiciones, se realizaron a las 8 y 72 h después de la transfección. Bajo ninguno de los tres tratamientos (siPORT, siRNA-AnxA2 y siRNA-ctrl) se observó una reducción de la viabilidad celular menor al 90%, aun después de las 72 h post transfección; lo que nos indica que el silenciamiento de AnxA2 en células CrFK, bajo las condiciones empleadas, no afecta la viabilidad de dichas células.



**FIGURA 9. VIABILIDAD DE CÉLULAS TRANSFECTADAS CON LOS siRNA-ANXA2 Y siRNA-CTRL.** Las células CRFK se transfectaron en presencia del siPORT, con el siRNA-ctrl, con los siRNAs-AnxA2 o sin siRNA alguno. A las 72 h post transfección se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT. A las células control sin tratamiento se les asignó el valor del 100% de viabilidad y con respecto a este, se graficaron las absorbancias de las células transfectadas. La absorbancia de cada una de las muestras se determinó a 590 nm, en un lector Biotek; ( $p > 0.05$ ).

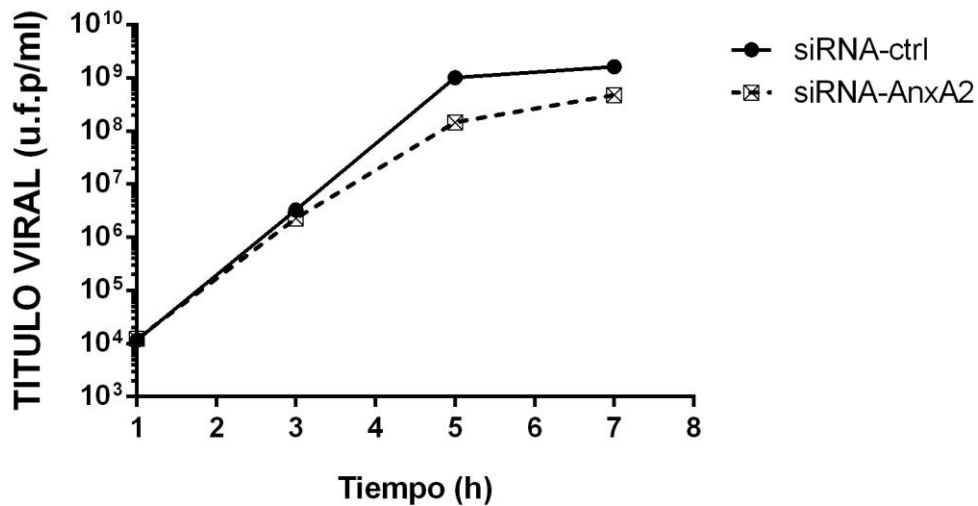


Tras verificar que las condiciones de transfección de los siRNAs no afectaban de manera significativa la viabilidad celular, monocapas de células CrFK se trataron con los siRNA-AnxA2 y siRNA-ctrl, por separado. Después de 72 h de interferencia, las células se infectaron con el FCV a una M.O.I. de 5. Las células tratadas con el agente transfectante (siPORT) o con el siRNA-ctrl muestran el efecto citopático típico de la infección, con el redondeo de las células y la consecuente falta de contacto entre ellas.



**FIGURA 10. EFECTO CITOPÁTICO TRAS LA INFECCIÓN POR EL FCV DE CÉLULAS CRFK INTERFERIDAS CON LOS siRNA-ANXA2.** Imágenes tomadas por microscopía de luz, en donde se muestra el efecto citopático de células CRFK tratadas con el agente transfectante siPORT, el siRNA-ctrl o los siRNA-AnxA2 e infectadas por 5 h con el FCV.

Sin embargo, en las células interferidas con los siRNA-AnxA2 la monocapa se observa más íntegra, es decir con un efecto citopático menor (Fig. 10).



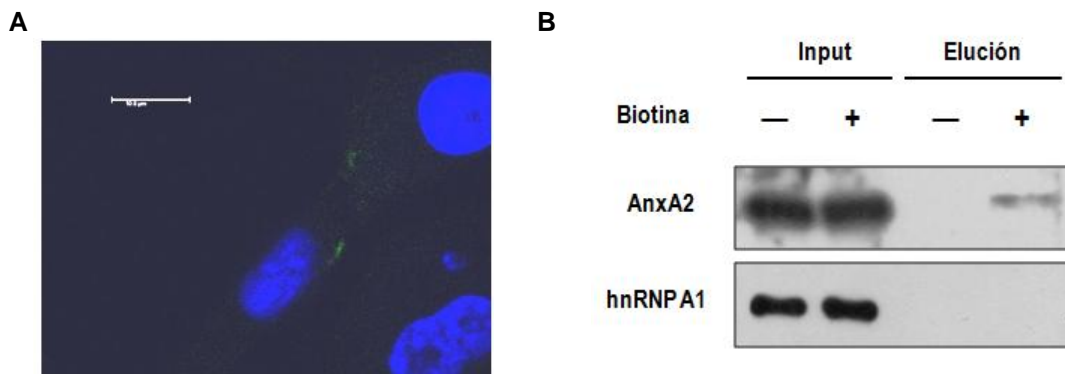
**FIGURA 11. CINÉTICA DE PARTÍCULA VIRALES EN CÉLULAS CRFK INTERFERIDAS CON LOS siRNA- ANXA2 E INFECTADAS CON FCV.** Células tratadas con el siRNA-ctrl (línea continua) y con el siRNA-AnxA2 (línea punteada) durante 72 h, se infectaron con el FCV a una M.O.I de 5. El título viral se determinó en sobrenadante celular obtenido a 1, 3, 5 y 7 h post infección por ensayos de plaqueo.

Asimismo, se evaluó la producción de partículas virales tras el tratamiento con el siRNA-ctrl y el siRNA-AnxA2 a diferentes tiempos post infección, en las que se pudo observar la disminución de casi un logaritmo en número de partículas virales en el sobrenadante a partir de las 5 hpi en comparación con el título viral de los sobrenadantes de las células transfectadas con el siRNA-ctrl e igualmente infectadas (Fig. 11).

Estos resultados confirman que la AnxA2 participa en la replicación viral.

## AnxA2 se expresa en la superficie de las células CrFK y no interacciona con los viriones del FCV

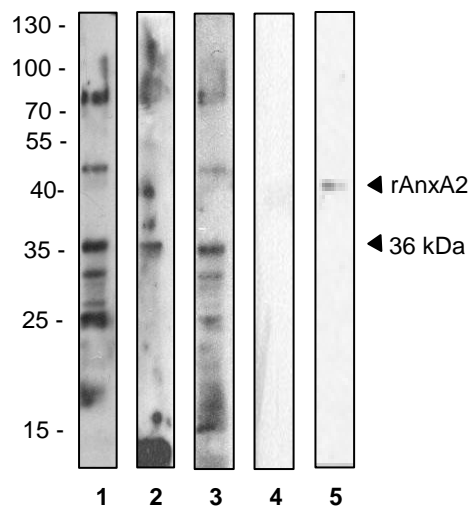
Dado que existe un reporte de que AnxA2 participa en la entrada del vesivirus del conejo RaV (que, al igual que el FCV, es miembro del género vesivirus), decidimos determinar si esta proteína celular también participaba en la entrada del FCV durante la infección de células CrFK. Primero determinamos si la AnxA2 se expresaba en la superficie de las células CrFK. Por ensayos de IF, en células no permeabilizadas, se pudo visualizar un pobre marcaje en color verde correspondiente a la AnxA2 presente en la superficie de esta línea celular (Fig. 12A). Para corroborar lo anterior, la monocapa de células CrFK se trató con biotina para posteriormente ser lisada y los complejos biotina-proteína de la superficie se precipitaron con perlas de agarosa estreptavidina (Fig. 12B).



**FIGURA 12. EXPRESIÓN DE ANXA2 EN LA SUPERFICIE DE CÉLULAS CrFK.** A) Inmunodetección de AnxA2 de superficie (verde) por microscopía de fluorescencia en células CrFK no permeabilizadas. B) Lisado de células tratadas con biotina, se interaccionaron con perlas de agarosa-estreptavidina. Los complejos formados se corrieron en geles de acrilamida 10% y se sometieron a ensayos tipo WB con anti-AnxA2 y anti-hnRNPA2 como control de que no hubo contaminación de proteínas del citoplasma.

Los complejos precipitados se sometieron a ensayos tipo WB, utilizando un anticuerpo anti-AnxA2 específico, corroborando la presencia de AnxA2 en la superficie de las células CrFK. La detección de la proteína hnRNPA1 solo en el input nos indica que no hubo contaminación de proteínas citoplásmicas.

Para determinar si AnxA2 interaccionaba con las partículas virales del FCV se realizó un ensayo de unión a proteína por superposición de virus (VOPBA, por sus siglas en inglés) (Fig. 13).



**FIGURA 13. ENSAYO DE UNIÓN A PROTEÍNA POR SUPERPOSICIÓN DE VIRUS (VOPBA).** Lisado de células no infectadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se interactuaron con viriones de FCV ( $10^{10}$  u.f.p./ml) y reveladas con anticuerpo anti-FCV (carril 1). Previo a la interacción con los viriones las membranas fueron tratadas con anti-AnxA2 (carril 3). La presencia de AnxA2 en los extractos se corroboró por WB (carril 2). La rAnxA2 (42 kDa) se corrió e interacciono con los viriones (carril 4). La presencia de la rAnxA2 se corroboró por WB (carril 5).

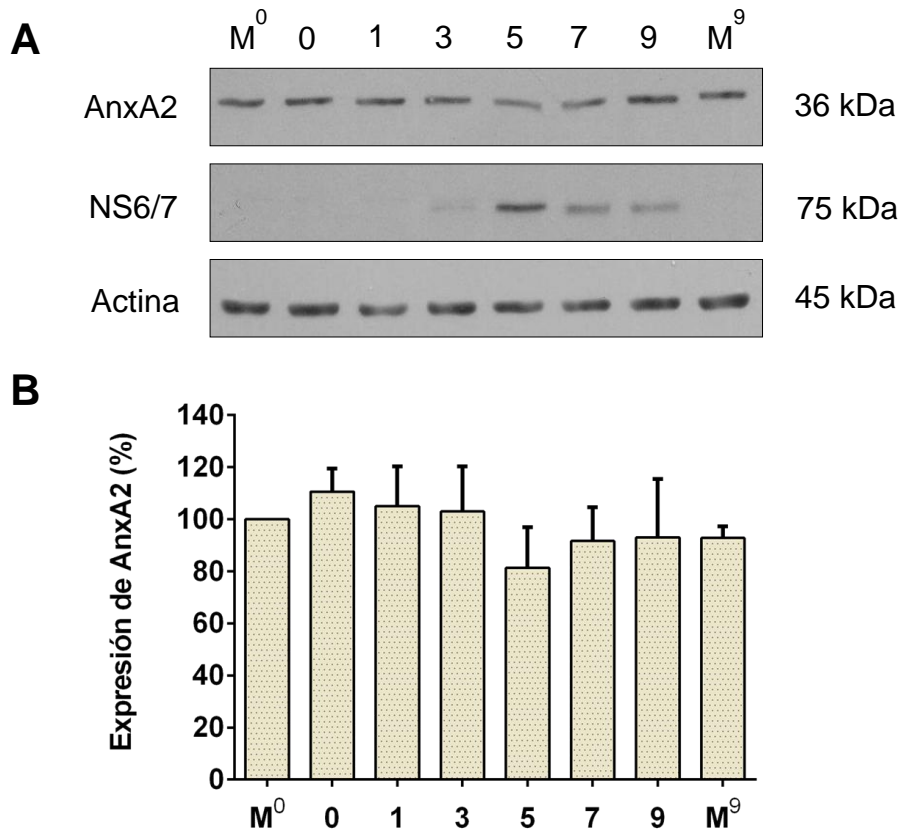
Extractos totales de células CrFK no infectadas se corrieron en geles de agarosa y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para posteriormente ser incubado con viriones del FCV ( $10^{10}$  u.f.p./ml). Las partículas virales fueron e inmunodetectadas por quimioluminiscencia utilizando un anticuerpo específico contra la cápside del FCV, observando la formación de

múltiples interacciones entre las cuales se localizaba una a la altura de 36 kDa que correlaciona con el peso molecular de JAM1, el receptor reportado para FCV y también con el de la proteína AnxA2. La migración de AnxA2 en este peso molecular de 36 kDa, se corroboró por mediante un ensayo tipo WB (Fig. 13, carril 2).

Para determinar si la interacción observada a 36 kDa correspondía a la de AnxA2-virión se utilizó un anticuerpo específico anti-AnxA2 previo a la incubación de la membrana con los viriones, observando que la interacción seguía dándose en la misma intensidad (Fig. 13, carril 3). El hecho de que los anticuerpos anti AnxA2 no redujeran la interacción de los viriones con la banda de 36 kDa indica que FCV no se une a esta proteína y sugiere que la interacción podría estar ocurriendo con la molécula JAM1. Para determinar si FCV se unía a AnxA2, se realizaron ensayos de VOPBA utilizando a la proteína AnxA2 recombinante (rAnxA2) purificada (para su obtención ver Anexo A), que presenta un peso molecular de 42 kDa (Fig. 13, carril 4). La ausencia de interacción con esta proteína recombinante, confirma los resultados obtenidos con los extractos totales que sugieren fuertemente que FCV no se une a AnxA2. La migración de la proteína rAnxA2 recombinante se corroboró por WB utilizando un anticuerpo comercial (Fig. 13, carril 5).

### **Los niveles de AnxA2 y su distribución no se modifican durante la infección**

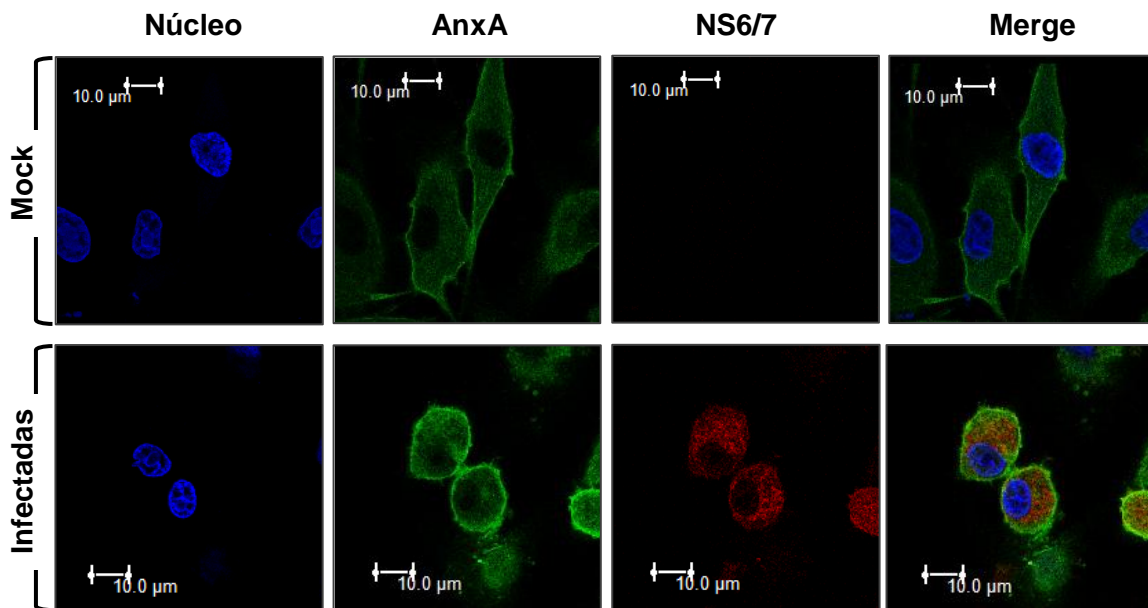
Una vez corroborada la participación de AnxA2 durante la replicación del FCV, era importante verificar si esta proteína celular se modulaba durante la infección viral. Es por ello que se analizaron los niveles totales de AnxA2 en células no infectadas (mock) e infectadas con el FCV a diferentes tiempos, mediante ensayos tipo WB (Fig. 14A).



**FIGURA 14. NIVELES DE ANXA2 DURANTE LA INFECCIÓN POR EL FCV.** A) Detección de la proteína AnxA2 en extractos de células infectadas con el FCV a las 0, 1, 3, 5, 7 y 9 h mediante ensayos tipo WB la proteína viral NS6/7 se utilizó como control de infección; y la actina como control de carga. B) Valores relativos (%) de la expresión de AnxA2 durante la infección por el FCV, obtenidos por densitometría promediando el valor de tres experimentos independientes; ( $p > 0.05$ ). M: extractos proteicos de células mock infectadas

Los niveles de AnxA2 en los extractos de células infectadas a los diferentes tiempos con el FCV permanecieron constantes a lo largo de la infección y semejantes a los detectados en las células mock (Fig. 14). El análisis densitométrico de la intensidad de las bandas obtenidas en tres experimentos independientes corroboraron que no existen cambios significativos en los niveles totales de AnxA2 a los diferentes tiempos postinfección (Fig. 14B).

Una vez determinado que no se modificaban los niveles de AnxA2 durante la infección por el FCV, quisimos determinar si durante la infección, se modificaba la distribución subcelular de esta proteína, para lo cual se sembraron células sobre cubreobjetos, se infectaron o no (mock) con el FCV a una M.O.I. de 5 por 5 h y la presencia de la AnxA2 se determinó mediante inmunofluorescencias utilizando anticuerpos específicos contra AnxA2, seguidos de un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (verde) (Fig. 15); como control de infección, se puede observar a la proteína NS6/7 marcada en rojo (Alexa 564). Aunque la morfología de las células es claramente distinta, ya que las no infectadas presentan una forma alargada mientras que las células infectadas tienen una forma redondeada, la distribución de AnxA2 en ambas células es claramente citoplásmica y en la membrana plasmática (Fig. 15) sugiriendo que esta proteína no modifica su localización subcelular durante la infección.

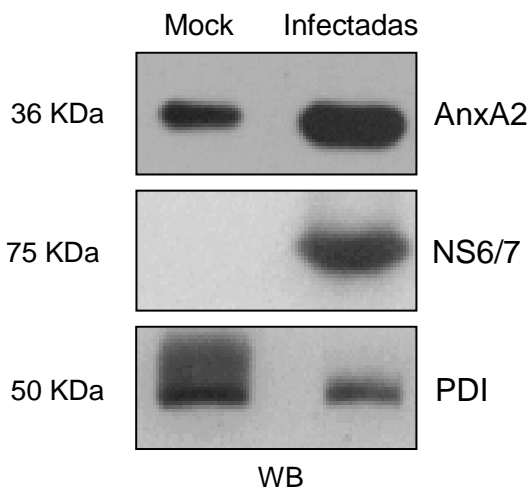


**FIGURA 15. DISTRIBUCIÓN DE ANXA2 INTRACELULAR DURANTE LA INFECCIÓN POR EL FCV.** Células CrFK Mock o infectadas por el FCV durante 5 h se trataron y fijaron, para su marcaje con anti AnxA2 y anti-NS6/7, seguido de sus anticuerpos secundarios correspondientes (Alexa 488 y 564); para su posterior visualización por microscopía confocal.

Aunque no se observaron cambios visibles en la expresión, y distribución de AnxA2 durante la infección por el FCV, se pudo identificar una cierta colocalización entre AnxA2 y la proteasa-polimerasa NS6/7 en la región perinuclear (Fig. 15; merge, flecha blanca), lo que sugiere la posible presencia de la proteína celular AnxA2 en los complejos de replicación formados por el FCV en células tras 5 h de infección.

### **AnxA2 está presente en los complejos de replicación formados por el FCV en células infectadas**

Para determinar si AnxA2 se encuentra localizada en los complejos de replicación de células infectadas por el FCV, la Dra. Clotilde Cancio Lonches aisló las fracciones celulares en donde se encuentran los RC siguiendo el protocolo descrito por Green y colaboradores en el 2002, a partir de células CrFK no infectadas e infectadas a 5 h a una M.O.I. de 5, y la presencia de la AnxA2 en cada fracción se analizó por ensayos tipo WB utilizando anticuerpos específicos (Fig. 16).



**FIGURA 17. RECLUTAMIENTO DE ANXA2 HACIA LOS CR FORMADOS TRAS LA INFECCIÓN POR EL FCV.** CR de células mock (carril izquierdo) e infectadas durante 5 h por el FCV (carril derecho) se aislaron y sometieron a ensayos tipo WB; donde se visualiza a AnxA2 de 36 KDa; a la proteína proteasa polimerasa NS6/7 de 75 KDa, como control de infección; y a la proteína PDI de 50 KDa, residente del RE, como control de carga.



La presencia de AnxA2 se observó tanto en la fracción membranosa aislada de células mock, como en las fracciones provenientes de células tras 5 h de infección con FCV. La cantidad de AnxA2 en la fracción membranosa aislada de las células infectadas con el FCV era mayor que en las células mock. Estos resultados indican que a pesar de ser una proteína residente del RE, AnxA2 es reclutada hacia estos complejos tras la infección por el FCV. La presencia de la proteína viral NS6/7 indica la infección y la proteína disulfuro isomerasa (PDI) residente del RE, indica que la fracción membranosa corresponde al RE.

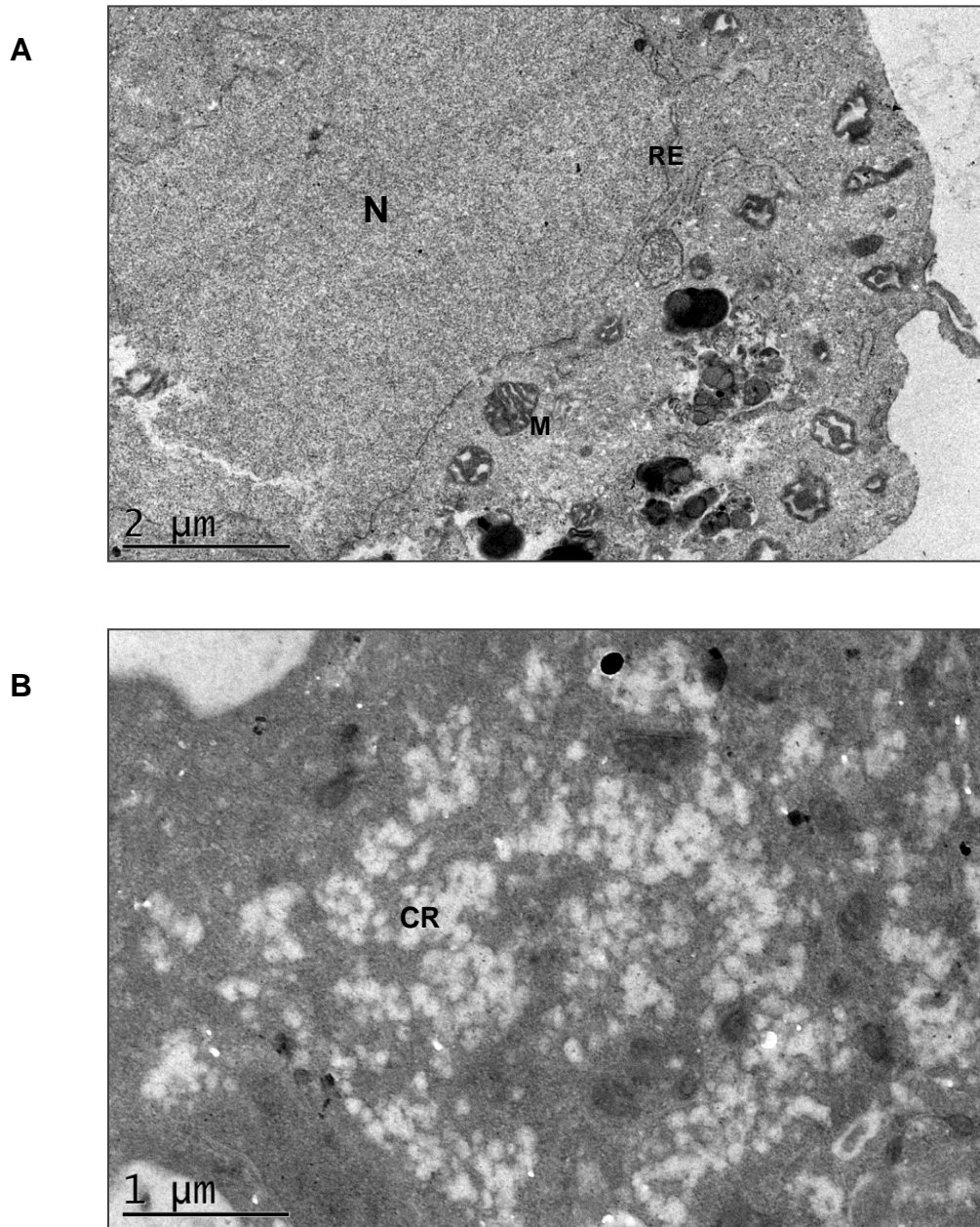
Otra forma de corroborar la presencia de AnxA2 dentro de los complejos de replicación fue mediante inmunomarcaje observado por microscopia electrónica de transmisión.

Con la colaboración de la Dra. Bibiana Chávez-Munguia y de la Biól. Anel Lagunes-Guillén, se realizó el montaje de células CrFK mock e infectadas durante 5 h por el FCV, para la visualización por MET.

Inicialmente se visualizaron células sin marcaje para observar el efecto citopático producido tras la infección por el FCV. En las células mock se puede observar el núcleo celular bien definido, rodeado del retículo endoplásmico y otros organelos celulares como las mitocondrias (Fig.17A); sin embargo, en las células infectadas por el FCV se puede observar un gran número de agregados vesiculares o estructuras membranosas ampliamente distribuidos a lo largo del citoplasma, que corresponden a los sitios de replicación viral (Fig.17B).

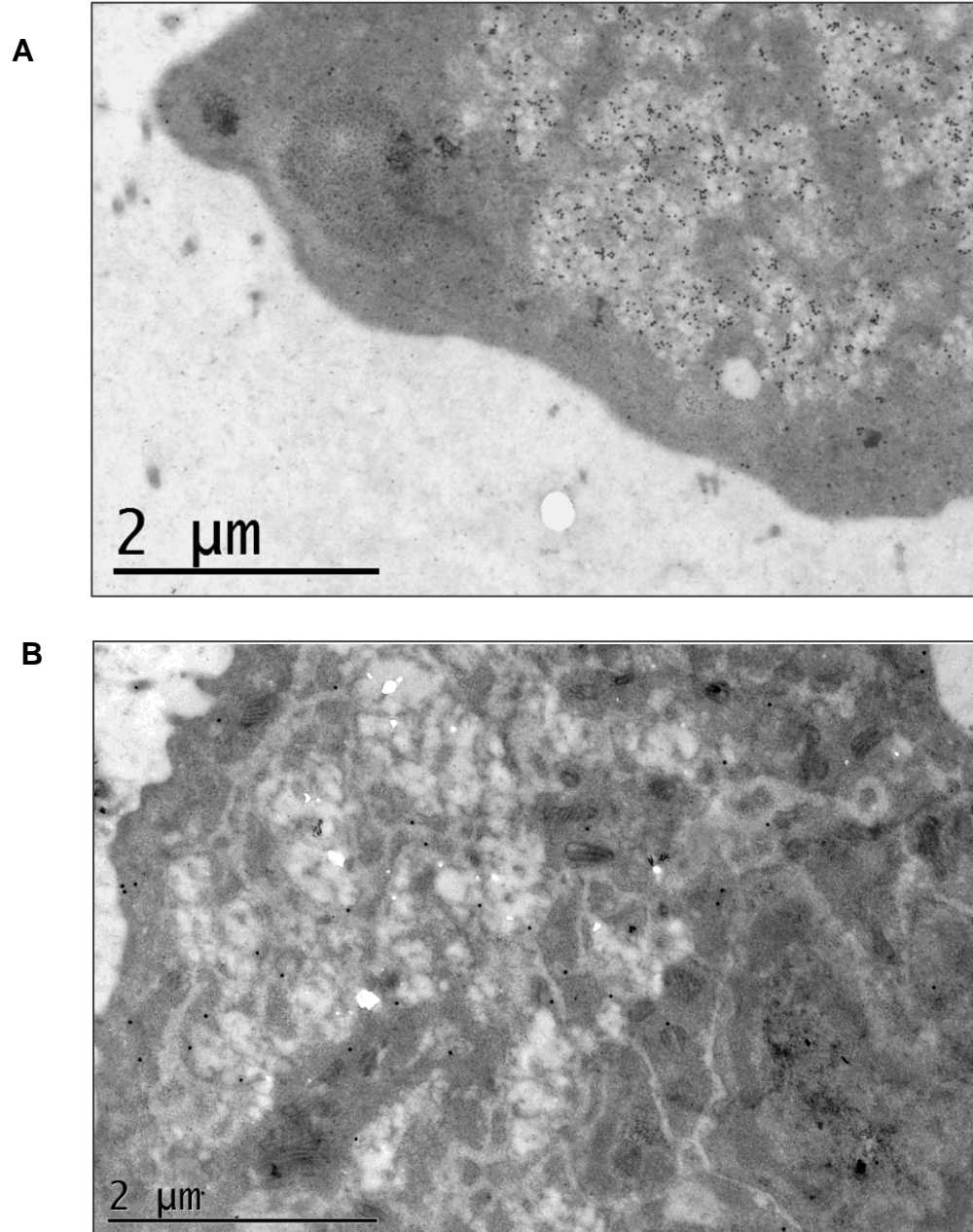
Para corroborar que estos sitios correspondían a los complejos de replicación del FCV se utilizó un anticuerpo específico para la detección del RNA de doble cadena, RNA<sub>dc</sub> (Fig. 18A), seguidos de anticuerpos secundarios anti-ratón acoplados a partículas de oro; dichas partículas de oro se observaron

abundantemente dentro de estos agregado vesiculares o estructuras membranosas corroborando que dichas estructuras correspondía los sitios de replicación del FCV.



**FIGURA 17. EFECTO CITOPÁTICO EN CÉLULAS CRFK TRAS LA INFECCIÓN POR EL FCV.** Células mock (A) e infectadas durante 5 h por el FCV (B) se montaron para su visualización por MET. En negritas N es el núcleo celular; M las mitocondrias; RE el retículo endoplásmico; y CR los complejos de replicación.

Por otro lado, se evaluó la localización de AnxA2 en las células infectadas, en donde pudimos observar la presencia de AnxA2 dentro de estas mismas estructuras.



**FIGURA 18. UBICACIÓN DE ANXA2 Y EL RNAdc DEL FCV EN LOS SITIOS DE REPLICACIÓN VIRAL.** Secciones delgadas (60 nm) de células infectadas durante 5 h por el FCV se incubaron con anticuerpos anti-RNAdc hecho en ratón, 1:60 (A); o anti-AnxA2 hecho ratón (B), y con anticuerpos anti-IgG-ratón conjugadas con partículas de oro de 20 nm (Ted Pella Inc; 1:60) La visualización de las muestras se realizó por MET.

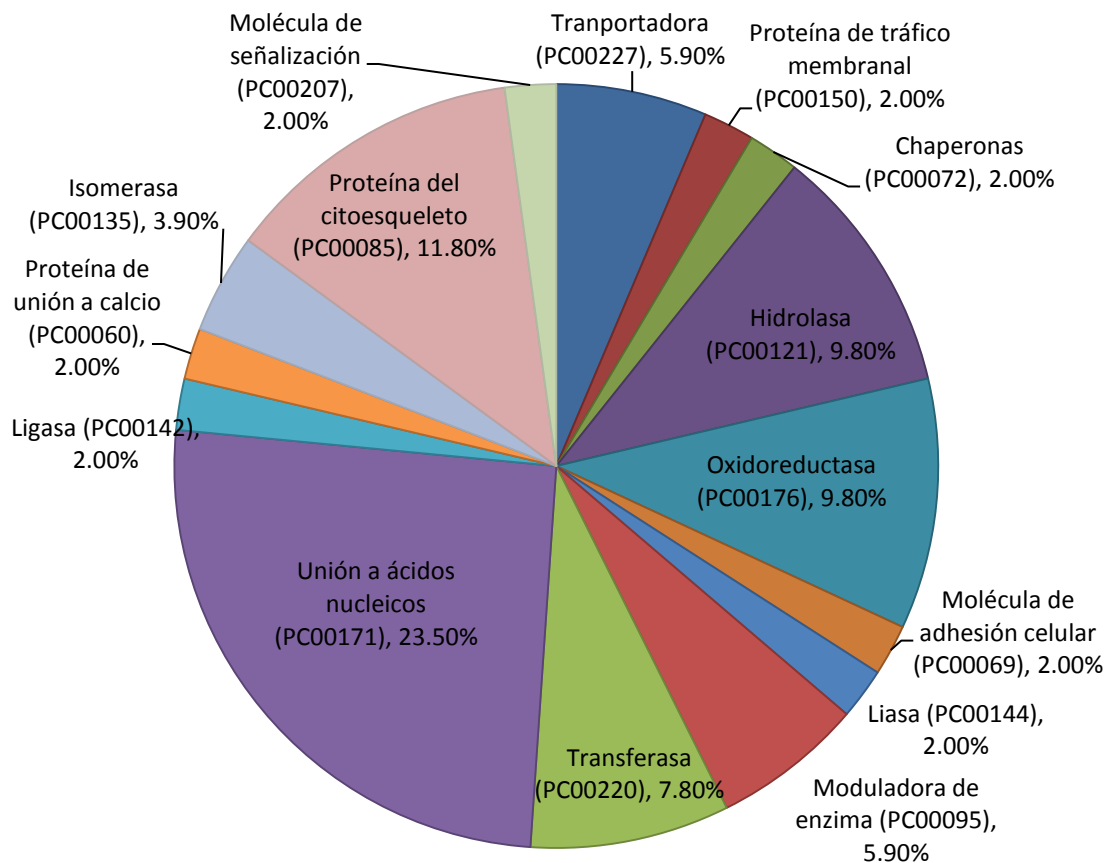
En la inmunotinción indirecta con partículas de oro de AnxA2 se observó un marcaje pobre, pero en su mayoría, asociada a los mismos agregados vesiculares o estructuras membranosas en donde se ubicó la presencia del RNAdc del FCV (Fig. 18B), lo que corrobora la presencia de que ambos elementos moleculares dentro de los sitios de replicación del FCV.

Debido a dificultades metodológicas, no se pudo llevar a cabo el doble marcaje de AnxA2 y el RNAdc, por lo que la inmunodetección se llevó a cabo por separado, pero al mismo tiempo.

Con la intención de realizar el doble marcaje (RNAdc-FCV/AnxA2) se procedió a desarrollar un anticuerpo anti-AnxA2 inmunizando conejos (Anexo A), sin embargo el anticuerpo obtenido solo fue útil para ensayos tipo WB, no así para inmunomarcaje.

La presencia de AnxA2 también se determinó dentro de los CR mediante la identificación por espectrometría de masas de las proteínas presentes en estos complejos (Tabla 1). Para ello, se aislaron los complejos membranales correspondientes a los complejos replicativos de células infectadas, las proteínas presentes en estos complejos se purificaron y se analizaron por espectrometría de masas como se indica en la sección de materiales y métodos. Utilizando el sistema de clasificación disponible en el sitio web <http://pantherdb.org> se determinó que AnxA2 se encontraba presente en estos complejos (Figura 19). Asimismo, del total de proteínas identificadas en estos CR, la clase que mayormente se encontraba representada eran las que se caracterizaban por su capacidad de unión a ácidos nucleicos (23.5 %), seguidas de proteínas que participan en la estructuración del citoesqueleto (11.8 %) (Fig. 19).

Una vez corroborada la presencia de AnxA2 en los CR del FCV, era de nuestro interés determinar que proteínas presentes dentro de los CR interaccionaban con ella. Para ello, se realizó una inmunoprecipitación de AnxA2 presente en los CR aislados y un anticuerpo anti-AnxA2 específico, y las proteínas asociadas se identificaron mediante espectrometría de masas. Las proteínas identificadas y que se asociaban a AnxA2 fueron vimentina, actina, plectina y  $\alpha/\beta$  tubulina, todas involucradas en la estructuración del citoesqueleto (Tabla 2). Además junto con estas proteínas se identificaron las proteínas NS de FCV y la VP1. Lo que en conjunto nos confirma la presencia de AnxA2 dentro de los CR del FCV y su asociación con proteínas NS.



**FIGURA 19. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PRESENTES EN LOS CR IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.** Se aislaron los CR y las proteínas totales presentes se identificaron por espectrometría de masas se clasificaron según su función celular mediante la base de datos disponible en <http://pantherdb.org/>.

**Tabla 1. Total de proteínas identificadas en los CR de células infectadas por el FCV.**

No. Accesoión UNIPROT	Descripción	Nombre	Función biológica
M3W818_FELCA	Annexin (Fragment) OS=Felis catus GN=ANXA2 PE=3 SV=1	Anexina A2	Montaje en balsas de membrana, regulación positiva de la endocitosis mediada por receptores implicada en el transporte de colesterol, regulación positiva de la fusión de vesículas.
M3W612_FELCA	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=ACTB PE=3 SV=1	Beta actina	Citoesqueleto, adhesión focal.
M3WJ26_FELCA	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=VIM PE=3 SV=1	Vimentina	Regulación positiva de la traducción, regulación de la estabilidad del mRNA.
M3WSM7_FELCA	Histone H4 OS=Felis catus GN=HIST1H4A PE=3 SV=1	Histona 4	Transcripción, iniciación, ensamblaje de nucleosoma con plantilla de DNA.
M3VW11_FELCA	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=MYH9 PE=4 SV=1	Miosina cadena pesada 9	Reorganización del citoesqueleto de actina, movimiento basado en filamentos de actina, movimiento basado en microtúbulos.
M3WFR2_FELCA	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Felis catus GN=LMNA PE=4 SV=1	Lamina A/C	Regulación de la migración celular, regulación de la localización de proteínas al núcleo, establecimiento o mantenimiento de la polaridad del de los microtubulos del citoesqueleto.
K0J107_FELCA	Malate dehydrogenase OS=Felis catus GN=MDH2 PE=2 SV=1	Malato dehidoregenasa	Proceso metabólico de malato, respiración aeróbica, acetilación interna de los aminoácidos de proteínas
M3VX55_FELCA	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=HSPA9 PE=3 SV=1	Proteína de choque térmico (HSP70)	Exportación de proteínas desde el núcleo, plegamiento de proteínas, ensamblaje de clúster de hierro y azufre.
M3X2J1_FELCA	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=VDAC2 PE=4 SV=1	Canal ionico voltage dependiente 2	Unión de esperma a la zona pelúcida.
M3VW78_FELCA	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Felis catus GN=SLC25A6 PE=3 SV=1	Acarreador de soluto familia 5, miembro 6	Regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.
M3X3G2_FELCA	Histone H2B OS=Felis catus GN=LOC101092267 PE=3 SV=1	Histona H2B	Ensamble de nucleosoma
M3WQU6_FELCA	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=RDX PE=4 SV=1	Radixina	Unión a actina
M3WJ18_FELCA	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=MSN PE=4 SV=1	Moesina	Regulación positiva del endosoma temprano al transporte del endosoma tardío, regulación positiva de la localización de proteínas al endosoma temprano, acoplamiento de membrana a membrana.
M3WG78_FELCA	ATP synthase subunit beta OS=Felis catus GN=ATP5B PE=3 SV=1	ATP sintasa, subunidad beta	Síntesis de ATP acopla el transporte de protones.
M3X4F1_FELCA	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=PHB2 PE=4 SV=1	Prohibitina 2	Regulación negativa de la actividad del factor de transcripción de unión al ADN, importación de proteínas al núcleo, translocación, estabilización de proteínas.
M3XBV5_FELCA	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=CANX PE=3 SV=1	Calnexina	Plegamiento de proteínas, endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis de vesículas sinápticas.
M3W346_FELCA	Hexokinase OS=Felis catus GN=HK1 PE=3 SV=1	Hexokinasa 1	Homeostasis de glucosa celular, proceso glucolítico.
M3WWP2_FELCA	Heat shock protein 27 kDa beta-1 OS=Felis catus GN=HSPB1 PE=3 SV=1	Proteína de choque térmico 27 kDa	Plegado de proteínas mediado por chaperona, transducción de señal intracelular, regulación negativa de la vía de señalización apoptótica intrínseca

			inducida por estrés oxidativo
<b>M3WIX9_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=TUBA1C PE=4 SV=1	Tubulina cadena alfa	Procesos basado en microtubulos.
<b>M3W0N2_FELCA</b>	Histone H3 OS=Felis catus GN=H3F3A PE=3 SV=1	Histona H3	Proliferación celular, regulación negativa de la condensación cromosómica, regulación del ensamblaje complejo del centrómero.
<b>M3W9D5_FELCA</b>	Galectin OS=Felis catus GN=LGALS1 PE=4 SV=1	Galectina	Regulación positiva de la entrada viral en la célula huésped, diferenciación de mioblastos, diferenciación de células plasmáticas.
<b>M3XFZ3_FELCA</b>	Annexin OS=Felis catus GN=ANXA11 PE=3 SV=1	Anexina A11	Unión de ion de calcio, unión a fosfolípido dependiente de calcio.
<b>M3WG24_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=SERPINH1 PE=3 SV=1	Serpina familia H miembro 1	Proceso biosintético de colágeno, maduración de proteínas.
<b>M3VW73_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=HNRNPH1 PE=4 SV=1	Ribonucleoproteína Heterogenea nuclear	Regulación del empalme de RNA.
<b>RL40_FELCA</b>	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Felis catus GN=UBA52 PE=2 SV=2	Ubiquitina-proteína ribosomal 60S	Traducción
<b>M3WWF6_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=RPS27A PE=4 SV=1	Proteína ribosomal S27	Traducción
<b>M3VVH8_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=ACTN1 PE=4 SV=1	Alfa actina	Ensamble de haces de filamentos de actina, formación de enlaces cruzados de actina.
<b>M3X6F7_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=ACTN4 PE=4 SV=1	Alfa actinina	Unión a actina, unión a iones de calcio.
<b>M3W4X0_FELCA</b>	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Felis catus GN=CD44 PE=4 SV=1	CD44	Regulación negativa de la respuesta al daño del DNA, transducción de señales por mediador de clase p53, regulación positiva de ERK1 y cascada de ERK2.
<b>M3VY03_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=HNRNPU PE=4 SV=1	Ribonucleoproteína Heterogenea nuclear U	Regulación negativa de la actividad de la quinasa, regulación negativa de la elongación de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II, regulación positiva de la transcripción por la RNA polimerasa II.
<b>M3VXR8_FELCA</b>	Catalase OS=Felis catus GN=CAT PE=3 SV=1	Catalasa	Proceso catabólico de peróxido de hidrógeno, respuesta al peróxido de hidrógeno.
<b>M3WZB0_FELCA</b>	ATP synthase subunit alpha OS=Felis catus GN=ATP5A1 PE=3 SV=1	ATP sintasa, subunidad alfa	Proceso metabólico de lípidos, síntesis de ATP acoplado a transporte de protones.
<b>M3W668_FELCA</b>	Protein disulfide-isomerase OS=Felis catus GN=PDIA3 PE=3 SV=1	Proteína disulfuro isomerasa	Homeostasis redox celular, regulación positiva de la vía de señalización apoptótica extrínseca, plegamiento de proteínas.
<b>A0A0A0MPZ5_FELCA</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Felis catus GN=GAPDH PE=3 SV=1	Gliceralehido-3-fosfato dehidrogenasa	Proceso metabólico de la glucosa, proceso glucolítico.
<b>M3W269_FELCA</b>	Annexin OS=Felis catus GN=ANXA5 PE=3 SV=1	Anexina A5	Regulación negativa de la coagulación, respuesta a la sustancia orgánica.
<b>M3WG13_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=RPN2 PE=4 SV=1	Riboforina II	Glicosilación ligada al N de proteínas.
<b>M3VU92_FELCA</b>	Serine hydroxymethyltransferase OS=Felis catus GN=SHMT2 PE=3 SV=1	Serina hidroximetiltransferasa	Proceso biosintético de glicina a partir de serina, interconversión de tetrahidrofolato.

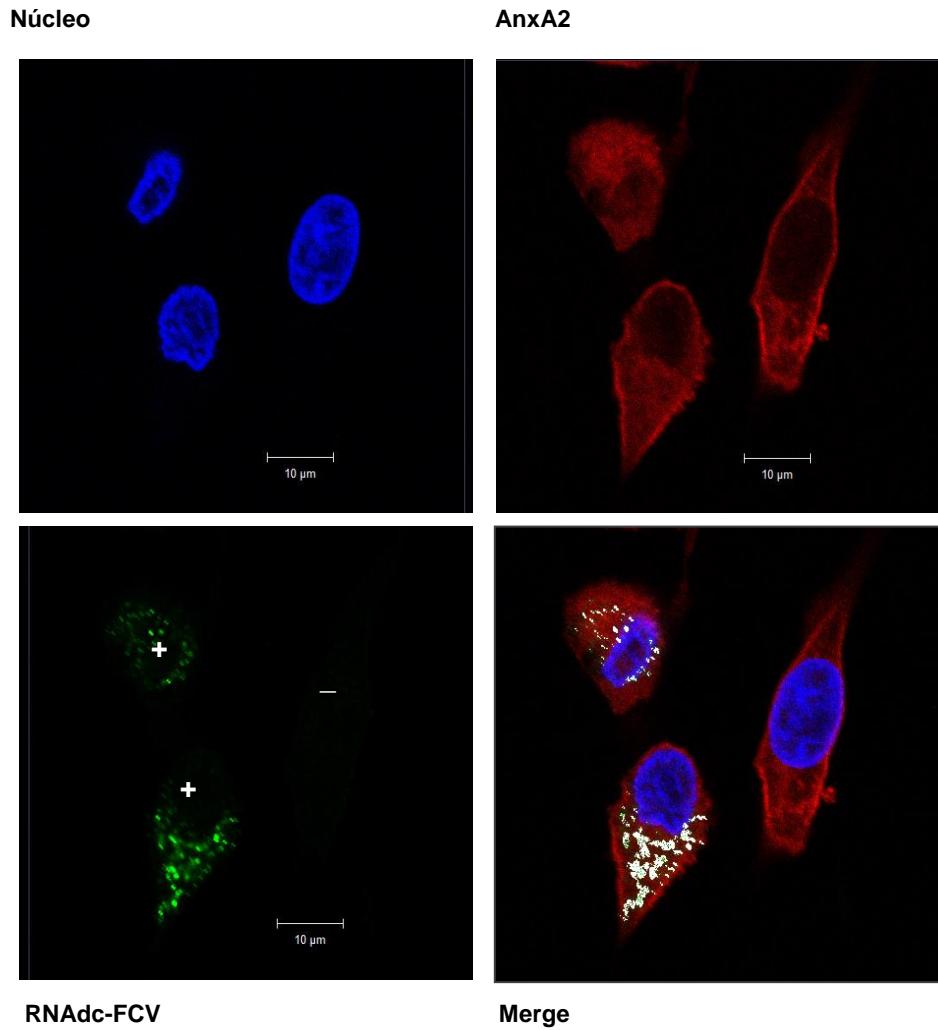
<b>M3W6M1_FELCA</b>	60S ribosomal protein L6 OS=Felis catus GN=RPL6 PE=3 SV=1	Proteína ribosomal S60	Traducción citoplásmica, constituyente estructural del ribosoma.
<b>M3WHH0_FELCA</b>	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha (Fragment) OS=Felis catus GN=ATP1A3 PE=3 SV=1	Sodio-potasio-ATPasa	Homeostasis del ion sodio celular, vía de señalización del receptor ionotrópico de glutamato.
<b>M3X9G5_FELCA</b>	Reticulon OS=Felis catus GN=RTN4 PE=4 SV=1	Reticulon	Organización de la red tubular de membrana del retículo endoplasmático, ensamblaje de complejo de poro nuclear.
<b>M3WIJ2_FELCA</b>	Annexin OS=Felis catus GN=ANXA4 PE=3 SV=1	Anexina A4	Unión de ion calcio, unión a fosfolípido dependiente de calcio.
<b>M3WDP0_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=PRDX3 PE=4 SV=1	Peroxiredoxina 3	Regulación negativa de la actividad de la quinasa, regulación positiva de la proliferación celular, organización mitocondrial.
<b>M3WLH7_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=HNRNPK PE=4 SV=1	Rebonucleoproteína heterogénea nuclear K	Regulación de la transcripción por RNA polimerasa II, procesamiento de RNA.
<b>M3W966_FELCA</b>	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 (Fragment) OS=Felis catus GN=RPN1 PE=3 SV=1	Proteína glicosiltransferasa subunidad 1 protein N-linked glycosylation via asparagine	Glicosilación ligada al N de proteínas vía asparagina.
<b>M3XFK8_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=TMEM109 PE=4 SV=1	Proteína transmembranal 109	Respuesta celular a la radiación gamma, regulación negativa de la muerte celular.
<b>G3XEW6_FELCA</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Felis catus GN=PPIB PE=2 SV=1	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	Plegamiento de proteínas mediada por chaperona.
<b>M3W858_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=EC11 PE=3 SV=1	Enoil-CoA delta isomerasa 1	Beta-oxidación de ácidos grasos.
<b>EF1A1_FELCA</b>	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Felis catus GN=EEF1A1 PE=2 SV=1	Factor de elongación 1-alfa	Actividad del factor de elongación de traducción, unión a GTP.
<b>M3W8Y9_FELCA</b>	REVERSED DNA-directed RNA polymerase OS=Felis catus GN=POLR1B PE=3 SV=1	RNA polimerasa dirigida por ADN subunidad beta	Transcripción de rRNA, transcripción por RNA polimerasa I, implantación de embriones.
<b>M3W0Z9_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus PE=3 SV=1	Tubulina cadena beta	Proceso basado en microtúbulos.
<b>M3WEE5_FELCA</b>	REVERSED Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=DNAH10 PE=4 SV=1	Dineína axonémica, cadena pesada 10	Movimiento basado en microtúbulos.
<b>M3X8N5_FELCA</b>	Uncharacterized protein OS=Felis catus GN=CLTB PE=4 SV=1	Clatrina, cadena ligera	Endocitosis dependiente de clatrina, transporte intracelular de proteínas.
<b>POLG_FCVUR</b>	Genome polyprotein OS=Feline calicivirus (strain Cat/United States/Urbana/1960) GN=ORF1 PE=1 SV=1	Poliproteína	Proteína no estructurales
<b>CAPSD_FCVUR</b>	Capsid protein OS=Feline calicivirus (strain Cat/United States/Urbana/1960) GN=ORF2 PE=1 SV=1	VP1	Cápside viral
<b>VP2_FCVUR</b>	Protein VP2 OS=Feline calicivirus (strain Cat/United States/Urbana/1960) GN=ORF3 PE=1 SV=1	VP2	Cápside viral



Tabla 2. Proteínas que interactúan con AnxA2 dentro de los CR del FCV.			
No. accesión UNIPROT	Descripción	Nombre	Función biológica
M3WJ26_FELCA	vimentin [Felis catus]	Vimentina	Constituyente estructural del citoesqueleto. Regulación positiva de la traducción, regulación de la estabilidad del mRNA.
M3WRZ7_FELCA	actin, cytoplasmic 2 [Felis catus]	Beta actina	Citoesqueleto, adhesión focal.
M3WCK3_FELCA	plectin [Felis catus]	Plectina	Unión a actina, unión a RNA, unión a cadherina, ensamble de hemidesmosomas.
M3W8I8_FELCA	annexin A2 [Felis catus]	Anexina A2	Montaje en balsas de membrana, regulación positiva de la endocitosis mediada por receptores implicada en el transporte de colesterol, regulación positiva de la fusión de vesículas.
M3WFX6_FELCA	tubulin alpha-1C chain [Felis catus]	Tubulina cadena alfa	Proceso basado en microtúbulos.
M3X7Z9_FELCA	PREDICTED: tubulin beta chain [Felis catus]	Tubulina cadena beta	Proceso basado en microtúbulos.
POLG_FCVF9	non-structural polyprotein [Feline calicivirus]	Poliproteína	Proteínas no estructurales
CAPSD_FCVF9 (VP1)	capsid protein [feline calicivirus FCV, F9, vaccine strain, Peptide Partial, 455 aa]	VP1	Proteína de la cápside

### AnxA2 colocaliza con el RNA del FCV en células infectadas

Dado que AnxA2 se encuentra en los complejos membranosos perinucleares que contienen a la replicasa viral, y a que en este compartimento se encuentra el RNA viral, quisimos evaluar si la AnxA2 se asociaba con el RNAdc mediante ensayos de inmunofluorescencia. Para ello, células infectadas por 5 h con el FCV, se inmunomarcaron con anticuerpo anti-RNAdc verde) en conjunto con anticuerpo anti-AnxA2 (rojo) (Fig. 20). La inmunodetección de AnxA2 se observó de manera homogénea en la monocapa celular; sin embargo, no en todas las células se pudo detectar el RNAdc del FCV, lo que indica que no todas se encontraban en la misma etapa de infección. Por otro lado, se observó que ambas moléculas colocalizan (puntos blancos), con un coeficiente de colocalización promedio de  $0.65 \pm 0.17$ ; lo que coincide con los ensayos anteriores en los que se demostró que AnxA2 forma parte de un complejo en el que además de asociarse con la replicasa viral, también se encuentra el RNA viral.



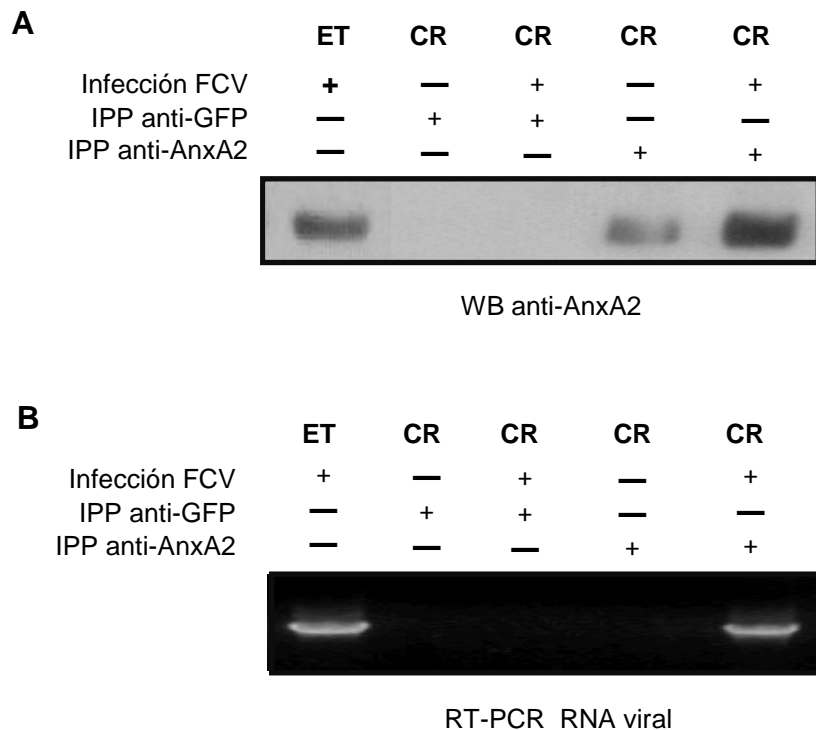
**FIGURA 20. COLOCALIZACIÓN DE ANXA2 Y EL RNADC DEL FCV EN CÉLULAS CRFK INFECTADAS.** Tras 5 h de infección por el FCV, células CrFk se trataron y fijaron, para su marcaje con anti AnxA2 y anti-NS6/7, seguido de los anticuerpos secundarios correspondientes (Alexa 488 y 564) para su posterior visualización por microscopia confocal. Como referencia, las células en proceso de infección están etiquetadas con + y las no infectadas con —. El ensayo se realizó por triplicado, obteniendo un coeficiente de colocalización de  $0.65 \pm 0.17$ , utilizando una  $n=30$  por ensayo.

### **AnxA2 se asocia con el RNA del FCV en las fracciones de los CR de células infectadas**

La reducción en la expresión de proteína y de la progenie viral en condiciones en las que la AnxA2 esta interferida así como la presencia de la AnxA2 en los CR en

la infección por FCV sugieren que esta proteína podría tener funciones en los eventos de replicación, traducción del RNA, ensamblaje de la partícula viral o en el propio ensamblaje de los complejos de replicación, como ha sido reportado para el HCV (111).

Para determinar si AnxA2 se asocia con el RNA viral en los CR, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación, para lo cual se utilizaron CR aislados de células infectadas por el FCV durante 5 h y sus correspondientes fracciones de células no infectadas (mock) e infectadas.



**FIGURA 21. ASOCIACIÓN DE ANXA2 CON EL RNADC DEL FCV DENTRO DE LOS CR EN CÉLULAS INFECTADAS.** Los CR de células CrFK infectadas durante 5 h por el FCV, y sus fracciones correspondientes en células no infectadas (mock), se aislaron y utilizaron para realizar ensayos de inmunoprecipitación usando un anticuerpo específico contra AnxA2 o un anticuerpo control (anti-GFP). (A) Los complejos inmunoprecipitados se sometieron a ensayos tipo WB usando un anticuerpo anti-AnxA2 específico. (B) A partir de los complejos inmunoprecipitados con AnxA2, se aisló el RNA total y se amplificó la región correspondiente a la NS6/7 del FCV mediante RT-PCR. En los extractos totales (ET) se muestra la presencia tanto de AnxA2 (A), como del RNA viral (B).

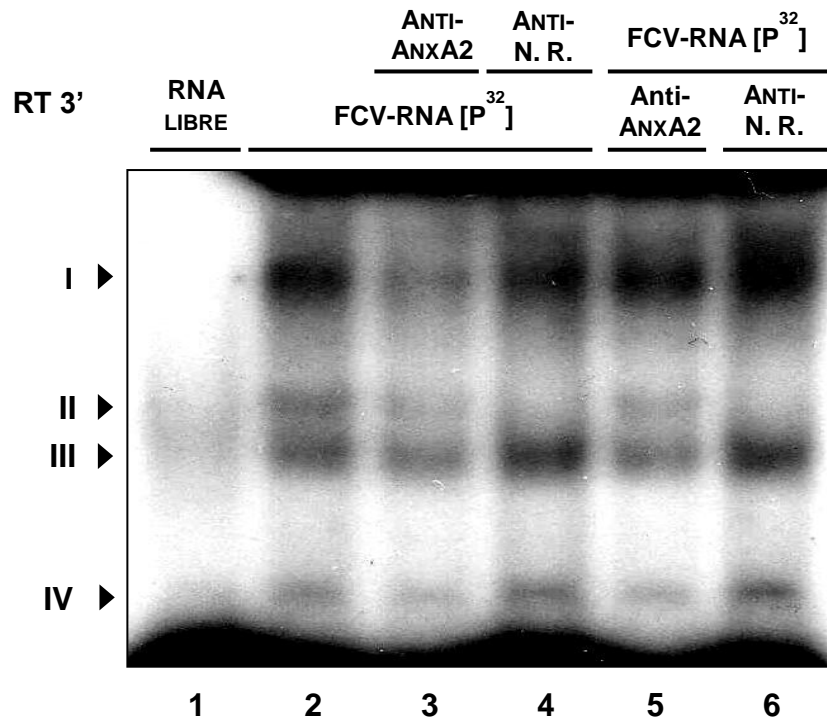
Dichas extractos se sometieron a inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo específico anti-AnxA2 o un anticuerpo control (anti-GFP). Tras la inmunoprecipitación los complejos inmunoprecipitados se sometieron a ensayos tipo WB (Fig. 21A), en donde se observó la presencia de AnxA2 en ambos extractos (mock e infectados) inmunoprecipitados con Anti-AnxA2, no así en los complejos en donde la inmunoprecipitación se llevó a cabo con el anticuerpo control. Más aun, tras la inmunoprecipitación se realizó una RT-PCR a dichos complejos inmunoprecipitados, amplificando la región del RNA que codifica para la NS6/7 del FCV (Fig. 22B); observando que sólo en los complejos de células infectadas e inmunoprecipitadas con el anti-AnxA2 se obtuvo el amplicón correspondiente, lo que indica que AnxA2 forma un complejo con el RNA viral dentro de los CR del FCV.

### **AnxA2 se asocia con la RNT 3' del RNA del FCV**

La mayoría de las proteínas celulares involucradas en los procesos de replicación viral se asocian a los RNAs virales, particularmente a sus extremos 5' o 3' terminales, sitios en donde se localizan la mayoría de los elementos de tallo y burbuja y las secuencias que albergan regiones regulatorias. Recientemente se ha descrito que AnxA2, posee la capacidad de unirse a las regiones 3' terminales de los RNAs celulares y virales y transportarlos hacia la región perinuclear (REF). Es por ello que una vez determinado que AnxA2 interacciona con el RNA viral proveniente de células infectadas, se realizaron ensayos de super-retardamiento (del inglés electromobility shift assays o EMSA) en presencia de anticuerpos anti-AnxA2, para determinar si la asociación ocurría con los extremos terminales del genoma,

Para determinar si AnxA2 se asociaba a estas regiones, tanto la región terminal (RT) 5' (primeros 260 nt del genoma del FCV), como la región no traducida (RNT) 3' (últimos 76 nt del genoma del FCV) se sintetizaron "*in vitro*" en presencia de un

nt radiactivo, para ser interaccionados con extractos proteicos totales de células CrFK; antes o después de la interacción de las RNT 3'/5' (por separado) con los extractos proteicos, estos últimos se pusieron a interaccionar con un anticuerpo monoclonal anti-AnxA2 dirigido contra región amino terminal o con un anticuerpo no relacionado; los complejos formados se analizaron por PAGE y autorradiografía (Fig. 22).



**Figura 22. Asociación de AnxA2 con la RT 3' del RNA del FCV *in vitro*.** Extractos de células CrFK se trataron con anticuerpo no relacionado o anti-AnxA2, previo o tras adicionar el transcrito de RNA correspondiente a la RT 3' del FCV radio marcado con [ $\alpha^{32}P$ ]-UTP. Los complejos formados se corrieron en geles nativos al 8%; para luego ser deshidratados y revelados por autorradiografía. Los complejos formados se señalan con puntas de flecha enumeradas del I al IV.

Ninguno de los ensayos realizados con la RT 5' revelaron evidencias de que AnxA2 se asocie con esta región (datos no mostrados). Sin embargo, los ensayos de super-retardamiento con la RNT 3', que es la región en la que se han reportado las interacciones entre AnxA2 con varios RNAs mensajeros y virales, revelaron la

formación de cuatro complejos, referidos como I, II, III y IV, derivados de la interacción con extractos totales de células CrFK no infectadas (Fig. 22 carril 2).

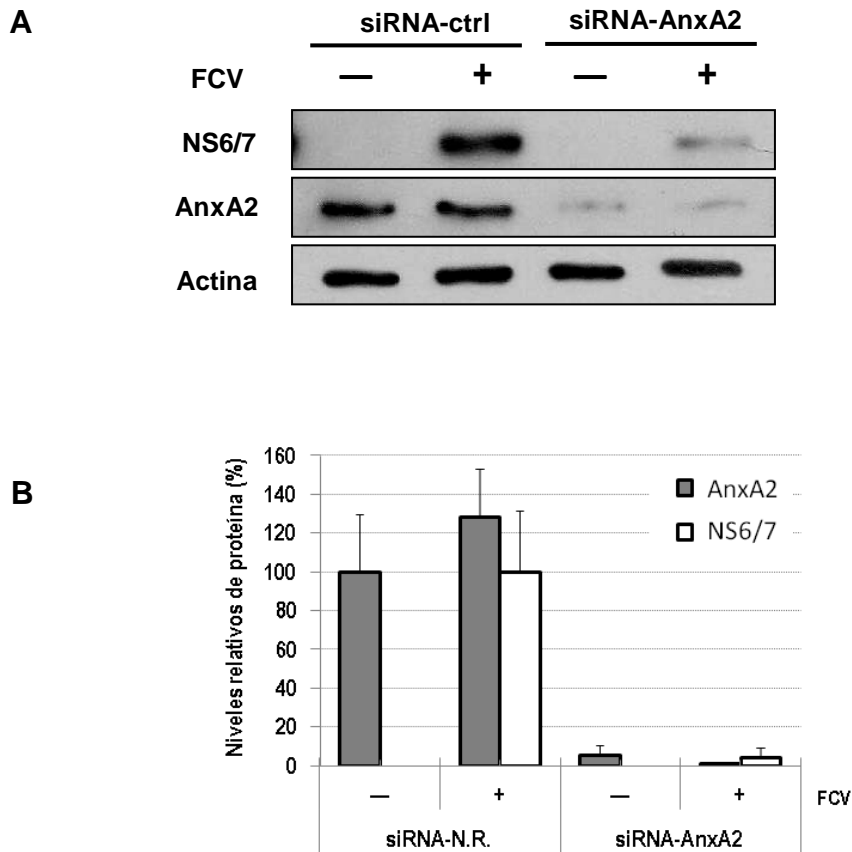
Cuando el anticuerpo anti-AnxA2 se incubó con los extractos totales antes de adicionar el RNA marcado con  $^{32}\text{P}$ , se observó una reducción en la intensidad de los complejos I, II y IV (Fig. 23, carril 3) sugiriendo que los anticuerpos anti-AnxA2 al interaccionar con AnxA2 bloquean su interacción con RNA viral. Caso contrario se observó cuando el anticuerpo anti-AnxA2 se adicionó después de agregar el RNA marcado con  $^{32}\text{P}$ , en donde solo el complejo II disminuyó en intensidad, sugiriendo que los anticuerpos no tienen acceso al sitio de unión del RNA presente en AnxA2 tras la asociación de AnxA2 con el RNA viral. Más aun, al utilizar la misma concentración de un anticuerpo no relacionado se alteró la formación del complejo II pero no se modificaron los complejos I, III y IV (fig. 22, carril 4), indicando no solo la presencia de AnxA2 en estos tres complejos sino la especificidad de los mismos.

### **La interferencia de AnxA2 causa una reducción en la síntesis de proteínas virales**

La asociación de AnxA2 con el RNA, particularmente con la RNT 3', sugiere que esta proteína podría estar jugando un papel específico en la traducción y/o la replicación del RNA. Para determinar la posible función de AnxA2 en la síntesis de proteínas virales, se evaluó la expresión de proteínas virales NS en células interferidas con un siRNA anti AnxA2 mediante ensayos tipo WB.

Tras la interferencia con los siRNA-AnxA2, el nivel de expresión de la proteína AnxA2 se redujo significativamente, como era de esperarse. Adicionalmente, los niveles de la proteína no estructural NS6/7 se observó reducido significativamente, en comparación con sus niveles de expresión en los extractos de células interferidas con el siRNA-ctrl (Fig. 23A, carriles 4 y 2 respectivamente). Esta disminución de la expresión de la proteína NS en las células interferidas con los

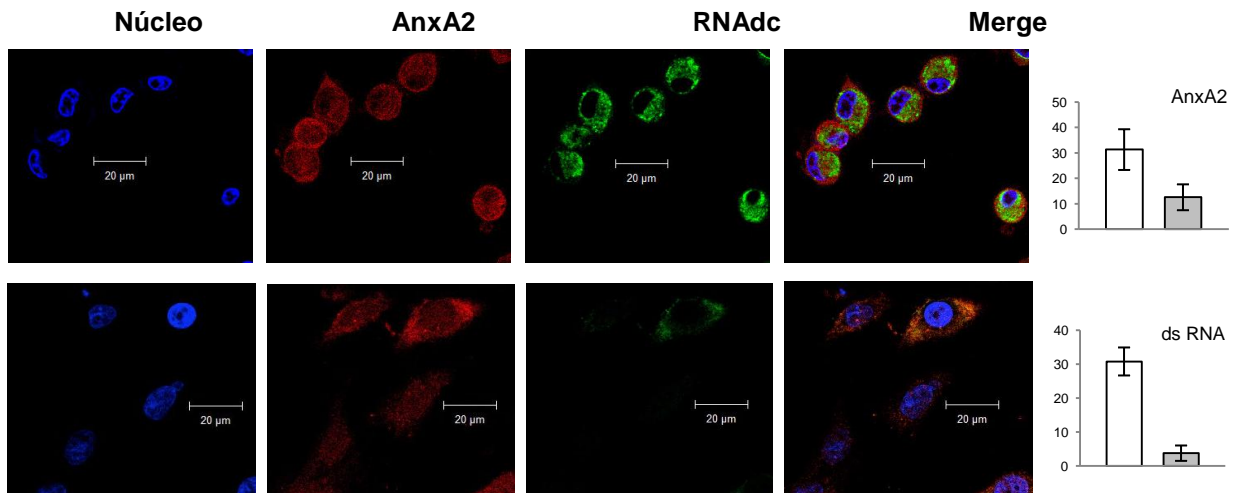
siRNA-AnxA2, resultó ser estadísticamente significativa, al analizarla por densitometría y al compararla contra la expresión obtenida en las células transfectadas con el siRNA-ctrl (Fig. 23B), lo cual nos sugiere que la proteína AnxA2 juega un papel en la síntesis del RNA o de la proteína viral. La reducción de AnxA2 en las células interferidas con los siRNA-AnxA2 así como la ausencia de la proteína viral en las células no infectadas se muestra como controles de interferencia e infección respectivamente. Los controles de carga se muestran con la expresión de actina



**FIGURA 23. EXPRESIÓN DE LA PROTEASA POLIMERASA NS6/7 DEL FCV TRAS LA INTERFERENCIA DE ANXA2.** a) Extractos proteicos de células CrFK no infectadas (N.I.) e infectadas (I), tratadas con siPORT, el siRNA-ctrl y con los siRNA-AnxA2 se separaron en PAGE-SDS, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con ab anti-3CD, anti-ANXA2 y anti-actina, como control de carga, y con sus respectivos ab secundarios acoplados a peroxidasa. b) Densitometría de la 3CD y ANXA2 bajo los distintos tratamientos. Ensayo representativo de tres realizados ( $p < 0.05$ ).

## La interferencia de AnxA2 causa una reducción del RNA del FCV

Los resultados anteriores demuestran que AnxA2 está presente en los CR, que se asocia al RNA viral, y que es necesaria para la producción eficiente de proteínas virales, sugiriendo que esta es importante para la traducción viral. Sin embargo, como los procesos de traducción y replicación del RNA dependen el uno del otro, es posible que la reducción en la síntesis de proteínas virales pudiera afectarse por una reducción del RNA viral en ausencia de AnxA2. Para determinar si AnxA2 es necesaria para la replicación del RNA viral, células no interferidas e interferidas con los siRNA-AnxA2, se trataron con anticuerpos específicos para la detección del el RNAdc, (Fig. 24).



**FIGURA 24. VISUALIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DEL RNA DEL FCV TRAS LA INTERFERENCIA DE ANXA2 *IN VIVO*.** Células tratadas con los siRNA-AnxA2 e infectadas durante 5 h por el FCV se trataron, fijaron e inmunomarcaron con anti AnxA2 y anti-NS6/7, seguido de los anticuerpos secundarios correspondientes (Alexa 488 y 564); para posteriormente visualizarlas por microscopia confocal.

Cuando las células se trataron con los siRNA-AnxA2, se pudo observar, que el inmunomarcaje de AnxA2 en la monocapa celular no es homogéneo, es decir que no todas las células presentan el mismo grado de interferencia de AnxA2, esto debido a que los siRNAs no ingresan de forma homogénea dentro de todas las

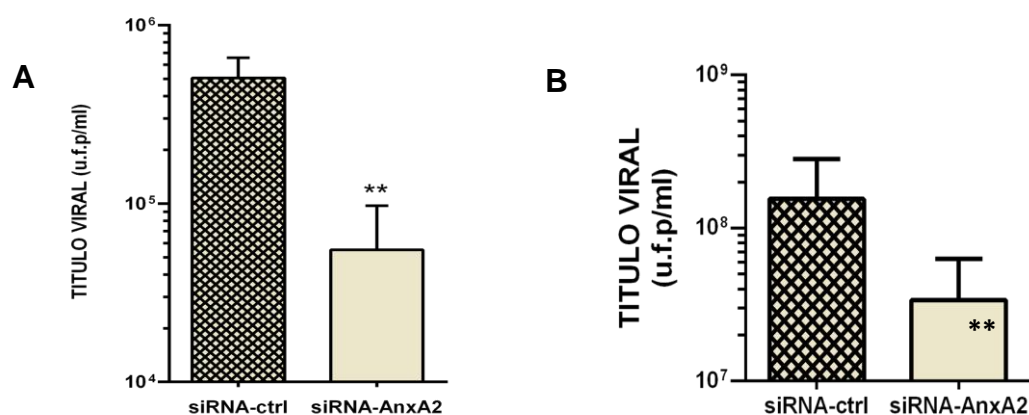


células que comprende la monocapa. Al investigar cómo era el nivel de expresión del RNAdc en estas células, se pudo observar que no todas las células presentan el mismo nivel de infección; siendo evidente que las células con mayor expresión de AnxA2 presentan mayor expresión de RNAdc, lo que nos indica que existe una estrecha relación entre la presencia AnxA2 y una eficiente síntesis del RNA del FCV.

Tomando en cuenta que AnxA2 no participa en la entrada del FCV, y que cuando se infecta con el FCV células que tienen una menor expresión de la proteína AnxA2, se reduce la cantidad de proteínas virales y del RNA del FCV, podemos sugerir que esta proteína celular es importante para la traducción y /o replicación del RNA viral.

### La disminución de la expresión de AnxA2 reduce la salida de partículas

Debido a que los resultados anteriores sugieren que AnxA2 participa en la traducción y/o replicación del RNA del FCV, quisimos determinar si la cantidad de partículas virales producidas durante la infección también se reducía como consecuencia de ello.



**FIGURA 25. EFECTO DE LA INTERFERENCIA DE LA ANXA2 EN LA SALIDA VIRAL.** Células tratadas con el siRNA-ctrl y tratadas con los siRNA-AnxA2 por 72 h, se infectaron con el FCV a una M.O.I de 5. Tras 5 hpi se determinó el título viral en el sobrenadante (A) o en el lisado celular (B) por ensayo de plaqueo; (p<0.05).

Es por eso que decidimos evaluar la cantidad de partículas virales producidas en células con una reducción en la expresión de AnxA2. Al cuantificar las partículas liberadas en el sobrenadante, así como las asociadas a las células tratadas con el siRNA-Anxa2 mediante ensayos de plaqueo, se observó una clara disminución de aproximadamente un log en el título viral en ambas fracciones, con respecto a los niveles de partículas virales de las células tratadas con el siRNA-ctrl (Fig. 25).

La disminución en la cantidad de partículas virales liberadas en sobrenadante así como las asociadas a las células indica una disminución en la producción de partículas y no a un déficit en la salida viral a consecuencia de la interferencia de AnxA2, lo cual correlaciona con un déficit en la producción de proteínas y RNA viral.

## Discusión

El FCV es un patógeno de felinos perteneciente a la familia *Caliciviridae*, causante de enfermedad respiratoria, conjuntivitis, estomatitis y hemorragia, con una alta morbilidad y mortalidad. Su facilidad de cultivo y contar con sistema de reversa genética ha permitido que este virus junto con el MNV sea uno de los menores modelos para el estudio de la biología de los virus que integran esta familia; los cuales, en su mayoría, no pueden propagarse en cultivos celulares.

La austeridad de los virus los obliga a ser dependientes de los componentes de las células que infectan para poder propagarse de manera exitosa. Es por ello que los virus desarrollan estrategias muy diversas para cumplir con cada uno de los pasos de su replicación. La participación de proteínas celulares en los procesos virales ha sido ampliamente documentada, demostrando la interacción de estas con diversos componentes virales, los cuales resultan responsables de la modulación de su expresión o de promover modificaciones post-traduccionales con consecuencias muy diversas. En nuestro grupo de trabajo, estamos interesados en la participación de proteínas celulares en la replicación de algunos de los miembros de la familia *Caliciviridae*, como una estrategia para el control de la replicación viral. Antecedentes en nuestro laboratorio reportaron cambios en la migración electroforética en geles de doble dimensión de AnxA2, una proteína de 36 kDa, involucrada en eventos celulares tales como la exocitosis, endocitosis, organización membranal, canales de intercambio iónico, además del rearrreglo del citoesqueleto (70).

La participación de AnxA2 durante procesos como la entrada, la replicación, y la morfogénesis de diversos virus ha sido ampliamente reportada (98, 101, 106, 111-112). Para evaluar su participación durante la replicación del FCV redujimos su expresión mediante el uso de siRNA de interferencia. Tras el diseño de un par de siRNA específicos contra el mRNA de la AnxA2 de felino, se redujo hasta un 93% la expresión de la AnxA2 en las células CrFK. La disminución de AnxA2 claramente causó un retraso en el efecto citopático observado por microscopia óptica y tuvo un efecto negativo sobre la producción de partículas virales en el sobrenadante celular, disminuyendo aproximadamente un logaritmo en comparación con los ensayos realizados con el siRNA control. Siendo la AnxA2 una proteína involucrada en múltiples procesos celulares y habiéndose reportado que participa activamente como un factor para el reclutamiento de la maquinaria replicativa de diversos virus, se realizaron diferentes ensayos con la finalidad de identificar en que parte del ciclo replicativo del FCV se daba la participación activa de la AnxA2.

Se tiene bien establecido que la molécula de adhesión JAM-1 y el ácido siálico  $\alpha$ 2,6 sirven como moléculas de unión durante la entrada del FCV (cepas F4, F9 y F25) (44, 46, 54). Sin embargo, dado que el antecedente más cercano sobre la participación de AnxA2 en una infección viral se da precisamente en la unión y/o internalización de un virus del mismo género, el RaV, aunado a que ha sido identificada como un factor celular implicado en distintos procesos de entrada para diversos virus entre los que se incluyen el HCMV, EV71 y HPV16, quisimos evaluar la posibilidad de que AnxA2 estuviera participando como un cofactor que, junto con JAM-1, facilitara la unión y posterior entrada del FCV a las células CrFK.

Se sabe que la localización subcelular de la AnxA2 está íntimamente regulada por distintos factores entre los que se encuentra la composición lipídica de las membranas, las modificaciones postraduccionales, la concentración de  $Ca^{2+}$ , el pH y la disposición de otras proteínas (114). Se ha demostrado que la traslocación de AnxA2 en la parte exterior de las células se da por una vía independiente a la

clásica (RE-Golgi) y no involucra la síntesis *de novo*; además, se requiere la presencia de p11 (S100A10) y de estar fosforilada en la Tyr<sup>23</sup> (78). AnxA2 ha sido detectada en la superficie de múltiples líneas de células endoteliales; y de igual modo, mediante ensayos de IF se observó que AnxA2 se expresa en la superficie de la línea celular CrFK, lo cual se corroboró con la biotinización de las moléculas de superficie.

Dada la poca expresión de AnxA2 en la superficie de las células CrFK, evaluamos de forma general si AnxA2 interaccionaba con las partículas virales del FCV de manera directa mediante ensayos tipo VOBPA. Entre las múltiples bandas obtenidas se puede observar una a la altura de 36 kDa, similar a la observada en los ensayos realizados por González-Reyes y col. (2009) en los que AnxA2 participa en la entrada del RaV; sin embargo, se pudo concluir que esta no correspondía a AnxA2 ya que, a diferencia de ellos, la unión de los viriones no se pudo disminuir o inhibir mediante el uso de anticuerpos específicos anti-AnxA2, llegando a la conclusión de que está banda correspondía a la interacción entre los viriones del FCV y la proteína JAM-1 que tiene un peso molecular entre los 36 y 41 kDa; más aun, los viriones del FCV no se unieron a la rAnxA2 demostrando que no existe la interacción entre AnxA2 y FCV bajo estas condiciones. Si los anticuerpos anti-JAM1 son capaces de inhibir la interacción entre el FCV y la banda de 36 kDa queda pendiente, ya que estos ensayos no pudieron realizarse por falta de reactivos.

Por otro lado, se sabe que tras la unión al receptor, el FCV es endocitado vía clatrina, para posteriormente liberar su genoma en el espacio citoplásmico, previa acidificación del endosoma (47). Creutz y Snyder, en el 2005, reportan que AnxA2 se une a las subunidades mu1 y mu2 del complejo proteínico adaptador 1 (AP1), uno de los componentes principales de las vesículas recubiertas de clatrina; además, indican que dicha interacción se da a través de un motivo presente en el N-terminal de AnxA2. Dada la presencia de AnxA2 dentro de la vía de internalización utilizada por el FCV, se podría sugerir que tras su interferencia, la

disposición de este factor celular sería menor y por lo tanto la vía de entrada se vería afectada, impidiendo o disminuyendo la cantidad de partículas presentes en el interior de la célula tras la hora previa de la adsorción del virus; sin embargo, en los ensayos de plaqueo realizados con el lisado celular de células interferidas con el siRNA-AnxA2 e infectadas con el FCV, se observó que la cantidad de partículas contabilizadas durante las dos primeras horas post infección no variaban, en comparación con el conteo obtenido en las células tratadas con un siRNA-ctrl. Estos resultados fortalecen la idea de que AnxA2 no participa durante las primeras etapas (unión/entrada) de la infección por el FCV.

Se ha observado que las concentraciones intracelulares de AnxA2 varían durante las distintas fases del ciclo celular; la síntesis de mRNA y de la proteína se da a inicios de la fase G1, mientras que su máxima expresión se presenta durante la fase S (115). Aunado a esto, su sobre expresión ha sido blanco de estudio en variedad líneas celulares y tejidos cancerosos, llegando a ser utilizada como un marcador de diagnóstico y como factor de pronóstico o de resistencia a fármacos (116). Por otro lado, no existen evidencias claras que sugieran que durante las infecciones virales aumente o disminuya la expresión de AnxA2 en el interior de la célula; sin embargo, Dziduszko y Ozbun, 2013, demuestran que al infectar queratinocitos humanos (HK) con el HPV16, aunque la expresión de la AnxA2 total no sufre cambios aparentes, los niveles de la AnxA2 fosforilada en la Tyr<sup>23</sup> (AnxA2-Tyr<sup>23</sup>) aumentan en las primeras horas de la infección, promoviendo su traslocación a la superficie celular y la participación en la entrada de este virus. En los resultados obtenidos con el FCV pudimos observar que la expresión de la AnxA2 total no presentó variaciones estadísticamente significativas durante la infección; sin embargo, queda pendiente determinar si, la fosforilación de AnxA2-Tyr<sup>23</sup> ocurre durante la infección con el FCV.

Coincidiendo con lo ya reportado para otras líneas celulares (69), se observó que en células CrFK, AnxA2 se encuentra ampliamente distribuida en la célula, principalmente en el citoplasmas y la membrana celular, y en menor grado en el

núcleo. Tras la infección por el FCV no se observaron cambios evidentes la distribución celular por IF, sin embargo, sorpresivamente se observó la colocalización de AnxA2 con la proteasa polimerasa NS6/7 viral en la región perinuclear.

La interacción de AnxA2 con proteínas NS virales ha sido ampliamente documentada. Se ha observado que AnxA2 se une a la RdRp Nsp9 del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), beneficiando la replicación viral. Por otro lado, se ha observado que AnxA2 se une a la NS5A mediante el dominio III de esta última, para mediar el ensamblaje viral (110). De igual modo, AnxA2 interacciona con la NS5A, proteína viral componente de los CR del virus de la fiebre porcina clásica (CSFV) y que tiene la habilidad de unirse a la polimerasa viral NS5B, sugiriendo su participación en el proceso de producción de dicho virus (112).

Tras estos antecedentes y el descubrimiento de la colocalización de AnxA2 con la proteasa polimerasa NS6/7 del FCV, se indagó sobre la posible participación de AnxA2 en la traducción y replicación del RNA viral. Inicialmente pudimos determinar que AnxA2 se encuentra presente dentro de los sitios de replicación conocidos como CR, visualizados como agregados vesiculares irregulares presentes en el citoplasma y característicos de diversos virus de RNA de polaridad positiva (57-58); cuya identidad se corroboró mediante el marcaje indirecto del RNAdc presente dentro de estas. Asimismo, la colocalización de AnxA2 con el RNAdc y con la NS6/7, confirma la interacción de estos elementos dentro los complejos de replicación inducidos por la infección por el FCV.

Lai y col, 2008, mencionan que para la replicación del RNA viral del HCV en los CR, estos últimos se asocian a membranas intracelulares, siendo esencial la presencia de las proteínas virales NS3 y NS5A (117). La inmunoprecipitación de estas proteínas virales NS revelaron la presencia de proteínas involucradas con la formación del citoesqueleto, tales como actina y tubulina; más aun, también

identifican a AnxA2 como parte del complejo precipitado. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por nuestro grupo de trabajo, donde tras la inmunoprecipitación de AnxA2 de los CR, identificamos estas mismas proteínas del citoesqueleto, junto con las proteínas NS del virus.

Se ha demostrado que AnxA2 es capaz de asociarse a poblaciones específicas de RNAm, y que participa en complejos ribonucleoproteicos de mensajero pequeños asociándose con estos y a polisomas unidos al citoesqueleto (118), ejemplos de estos RNA son los de *c-myc* y su propio RNAm (94-95), en donde la interacción AnxA2-RNA se lleva a cabo por el extremo 3'UTR de estos. Dichos estudios han sugerido, entre otras cosas, que el papel de AnxA2 es el de una proteína que participa en la localización de RNA y la asociación de este con el citoesqueleto y/o como un regulador de la traducción. En concordancia con lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo demostramos, mediante ensayos de IP y EMSA, que AnxA2 se asocia al RNA de FCV y que dicha asociación se lleva a cabo a través de la RT-3'. Estos hallazgos, junto con la observación sobre la colocalización de AnxA2 con la proteína líder de la cápside (LC) en la región perinuclear, hecha por Abente y colaboradores (41), colocan a la AnxA2 como un factor celular que participa en la replicación del FCV.

La participación de AnxA2 en la replicación de FCV se confirmó en una serie de experimentos en los que se disminuyó la expresión de AnxA2 utilizando los siRNA-AnxA2 específicos antes de la infección con FCV, observando claramente que la reducción de AnxA2 correlacionó con la reducción de la expresión de las proteínas NS virales y la producción de RNAdc, visualizado por IF. Más aún, se observó una disminución del número de partículas virales tanto en el sobrenadante como en las fracciones asociadas a las células como tras la interferencia de AnxA2, lo que indica que , existe una reducción en la formación de partículas virales, y no únicamente de la salida viral, indicando que AnxA2 es requerida para una replicación eficiente de FCV.



Por último, dado que el genoma de los virus de RNA de cadena positiva sirve como molde para la síntesis de las proteínas NS y estructurales, la replicación del genoma, y para ser empaquetado dentro de la cápside viral (49), resulta difícil establecer en qué punto del ciclo replicativo viral este es utilizado para cada propósito; por lo que la interacción AxnA2-RNA viral ubica a esta proteína celular como un factor necesario para la replicación y/o traducción del RNA viral; no obstante, debido a su interacción con el proteasa polimerasa viral y ubicación dentro de los CR, aunado a sus características funcionales de unión a membranas y a citoesqueleto, se podría especular que al igual que en el HCV podría estar participando como la formación de los CR virales o como vía para la interacción con los componentes del citoesqueleto; sin embargo, se requieren más estudios para corroborar esta hipótesis.

## **Conclusión**

Tomados en conjunto, nuestros resultados indican claramente que AnxA2 juega un papel importante durante la infección por FCV; particularmente en la traducción y replicación de su RNA. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar si esta proteína del huésped puede tener un papel multifuncional en el ciclo de replicación del FCV.

## Anexo A

### Clonación y expresión de la AnxA2 recombinante (rAnxA2)

Tras la obtención del cDNA de células CrFK no infectadas, se utilizó este como templado para la amplificación del gene de AnxA2. Para el diseño de los iniciadores, se utilizó la secuencia predicha para el mRNA de AnxA2 perteneciente a *Felis catus* disponible en la base de datos del NCBI con el número de accesión XM\_003987068.4 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM\\_003987068.4](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_003987068.4)) (Fig. 27A); en donde se seleccionaron las regiones de inicio y final del gene para el diseño de los iniciadores “sentido” y “antisentido”, respectivamente (Fig. 27B).

#### A PREDICTED: *Felis catus* annexin A2 (ANXA2), transcript variant X1, mRNA

NCBI Reference Sequence: XM\_003987068.2

[GenBank](#) [Graphics](#)

>gi|586988811|ref|XM\_003987068.2| PREDICTED: *Felis catus* annexin A2 (ANXA2), transcript variant X1, mRNA

```

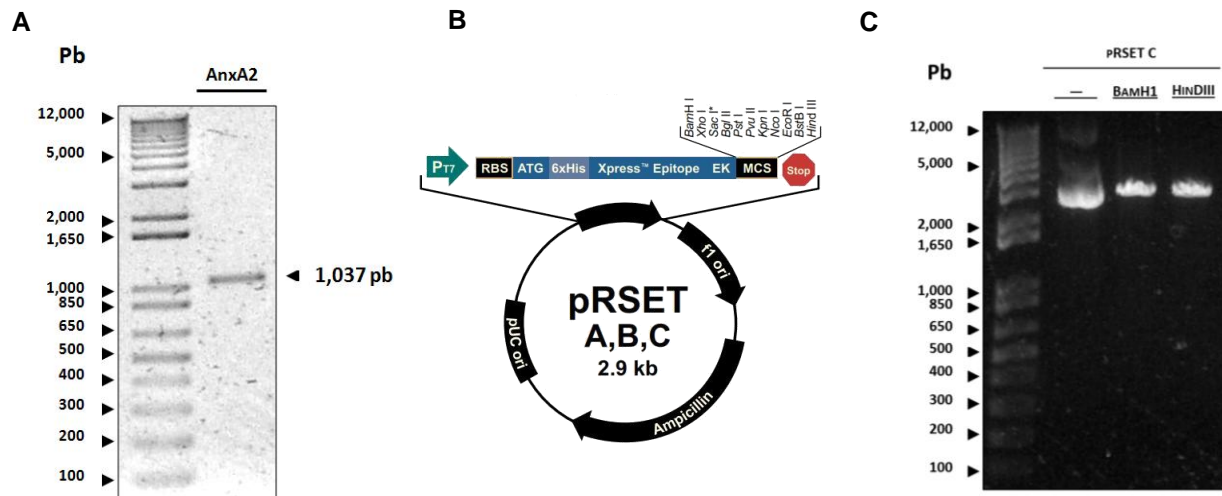
CGGCTATAAAAGCCCCAGGGCAGCCAGCTCTGCTGCACAACTGGGGACGCTCGCTGCTCTCGGCGC
CCGCGCCAGCTTCTTTCAAATGTCTACTGTTCACGAAATTCCTGCAAGCTCAGCTTGGAGGGTGATCA
CTCCACTCCCCAAGCGCATACGGGTCCGGTCAAAGCATACACCAATTTTGATGCTGAGCGTGATGCTCTG
AACATTGAAACGGCCATCAAGACCAAAAGGTGTGGATGAGGTCAACCATCGTCAACATTTTGACCAACCGCA
GCAATGAACAGAGACAGGATATTGCCTTCGCCTACAGAGAAGGACCAAAAAGGAACTTACATCAGCACT
GAAGTCAGCCTTGTCCGGCCACTGGAGACCGTGATTTTGGGCCCTTTGAAACACCTGCTCAGTATGAT
GCTTCTGAGCTGAAAGCCCTCCATGAAGGGGCTGGGACTGATGAGGACTCCCTCATTGAGATCACTGCT
CAAGGACCAACCAAGAGCTTCAGGAAATTAACAGAGTCTACAAGGAAATGTACAAGACTGATCTGGAGAA
AGACATCATTCTGACACATCCGGTGACTTCCGCRAGCTGATGTTGCCCTTGCAAAAGGGTAGAAGGCA
GAGGATGGCTCCGTCATTGATTATGAACGTGATTGACCAGGATGCTCGGGACCTCTATGATGCTGGAGTGA
AGAGGAAAGGAACAGACGTGCCCAAGTGGATCAGCATCATGACCGAGCGGAGTGTGTGTCACCTCCAGAA
AGTGTGTTGACAGGTACAAGAGCTACAGCCCTTATGACATGCTGGAGAGCATCAAGAAAGAGGTCAAAGGA
GACCTGGAAATGCTTTTCCGTAACCTGGTCCAGTGCATTGAGAACCAAGCCCTGTATTTTGTGACCGAC
TGTACGACTCCATGAAGGGCAAGGGGACTCGCGACAAAGTCCCTGATTAGAATCATGGTCTCTCGCAGTGA
AGTGGACATGTTGAAATTAGGTCTGAATCAAGAGGAAGTACGGCAAGTCCCTGTACTACTGCATCCAG
CAAGACACGAAGGGCGACTACCGAAGCGCTGCTGTACCTGTGCGGTGGGGATGACTGAGCCCATGACA
GCATGAGCGCCAGGAGCGGTGTTCCCTTTGTTTTTCAGCTAACAGTTCTAGAATAAGCTTGTGACTAACAG
CCCCCTTATGCTCATCCCTGCGAGGATGACGTTAGCATTGCCCTTCCCCATCTTTATTTCAATTGCGCTA
AGCATTGCCTGCCTCTCATGTCTAGTCTCTTTAGCCAAAGAAATGAACATTCGAAGGAGTTGGAAGTGAA
GCCTATGATGTGAAACACTTTGCCTCTTGTGTACTGTGTCATAAACAGATGAATAAACTGAATTTTACT
TTATAACAA
  
```

#### B

	Secuencia (5' – 3')	Longitud (nt)	Inicio (nt)	Fin (nt)	Tm	GC %
Sentido	<b>CCGGATCCGCCAGCTTCTTTCAAATGTCT</b>	23	1	23	59.99	43.48
AnxA2	BamHI					
Antisentido	<b>GCAAGCTTGTCAATCCACCGCACAG</b>	18	1034	1017	60.44	66.67
AnxA2	HindIII					

FIGURA 27. SECUENCIA DE ANXA2 DE *FELIS CATUS*. A) Secuencia de AnxA2 donde se muestra los nucleótidos a partir de los cuales se diseñaron los oligos para su amplificación. B) Oligos con los sitios de restricción enzimáticos.

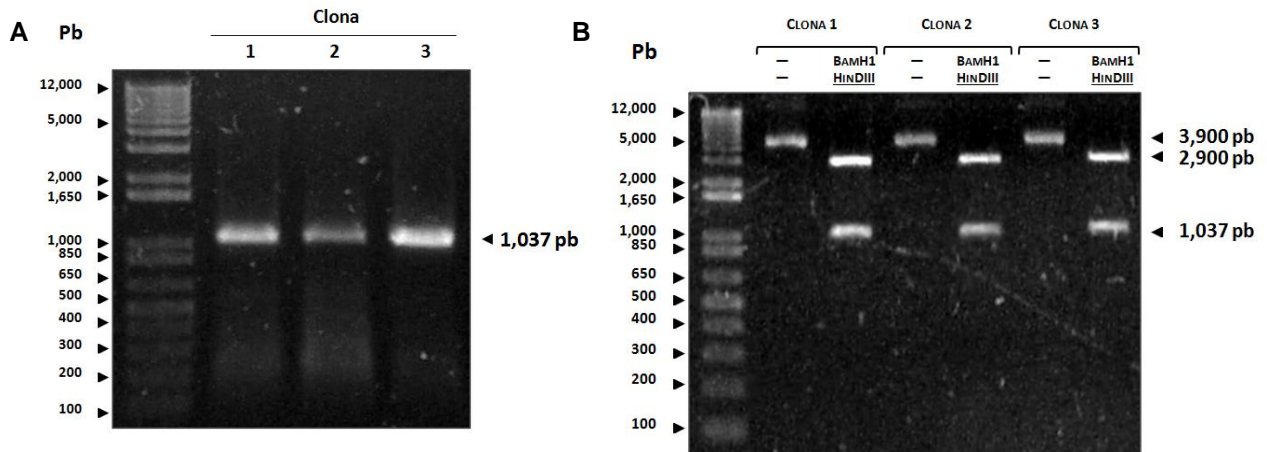
Al iniciador “sentido” se le añadió la secuencia que reconoce la enzima de restricción BamH1, mientras que al “antisentido” se le añadió la secuencia que reconoce la HindIII. Tras la amplificación del gene y la restricción con ambas enzimas el resultado era un amplicón de 1,037 pb, que correspondía con el tamaño esperado para el gene de AnxA2 (Fig.28A).



**FIGURA 28. PURIFICACIÓN INSERTO Y ALINEAMIENTO DE PLÁSMIDOS USADOS PARA LA EXPRESIÓN DE LA rANXA2.** A) Amplificación del gen de AnxA2 de 1,037 pb. B) Mapa del plásmido pRSET C, utilizado para la expresión de rAnxA2. C) Linearización del plásmido pRSET C mediante el uso de las enzimas BamH1 y HindIII.

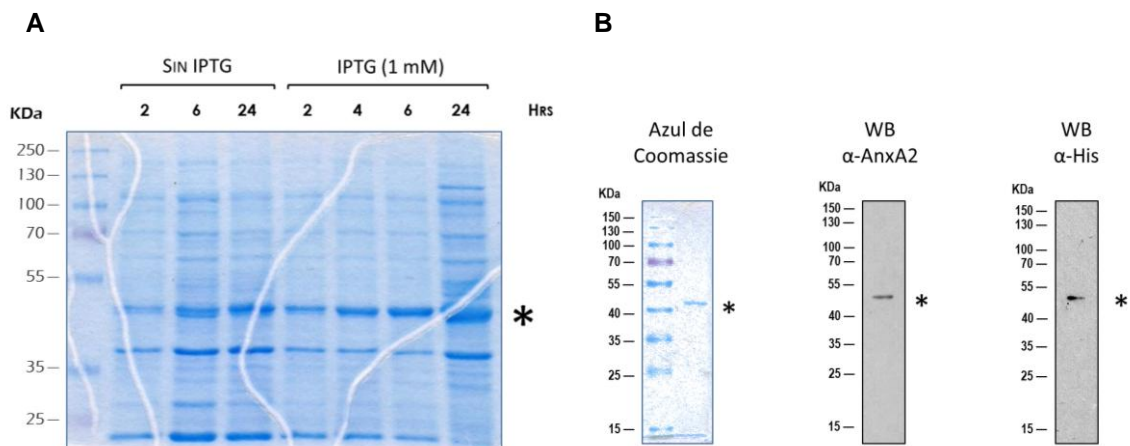
El plásmido que se utilizó para la expresión de la rAnxA2 fue el Prset C (Fig. 28B) donado amablemente por el Dr. Juan Salas Benito, el cual presenta los sitios de restricción para las enzimas BamH1 y HindIII, además de añadir una etiqueta de histidinas a la proteína recombinante. Debido a la cercanía de los sitios de restricción, y a la imposibilidad de ver el fragmento liberado, la digestión del plásmido por cada una de las enzimas se llevó a cabo en rondas diferentes según el protocolo del fabricante (New England Biolabs, Inc.) (Fig. 28C). Una vez linearizado el plásmido y purificado el inserto, se procedió a la ligación. El producto de la ligación se utilizó para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$ , las cuales se sembraron en placas con medio LB-agarosa. De las clonas obtenidas se seleccionaron tres, las

cuales se aislaron y crecieron en medio LB líquido. Tras purificar el plásmido de las tres clonas seleccionadas, se corroboró la presencia del inserto del gene de AnxA2 mediante la amplificación del segmento de 1,037 pb por PCR (Fig. 29A) y mediante la liberación del mismo con las enzimas de restricción (Fig. 29B).



**FIGURA 29. COMPROBACIÓN DE LIGACIÓN DEL INSERTO DENTRO DEL PLÁSMIDO.** La comprobación de la presencia del inserto del gen de AnxA2 dentro del plásmido en las tres clonas seleccionadas mediante: A) amplificación del gen de AnxA2 y B) digestión con las enzimas BamH1 y HindIII.

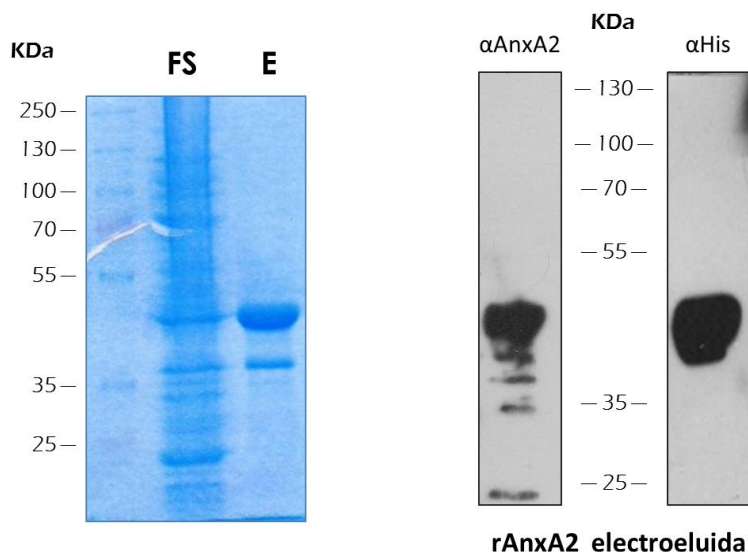
La expresión de la proteína recombinante se llevó a cabo en *E. coli* BL21, se probó la inducción en ausencia y presencia de IPTG 1 mM a diferentes tiempos posterior a la transformación, siendo el más óptimo a las 24 h en presencia de IPTG 1mM (Fig. 30A).



**FIGURA 30. INDUCCIÓN DE LA rANXA2.** A) Inducción de rAnxA2 en *E. coli* BL21 en presencia y ausencia de IPTG 1mM. B) Observación de la rAnxA2 por tinción de Coomassie y su identificación con anticuerpo anti-AnxA2 y anti-His.

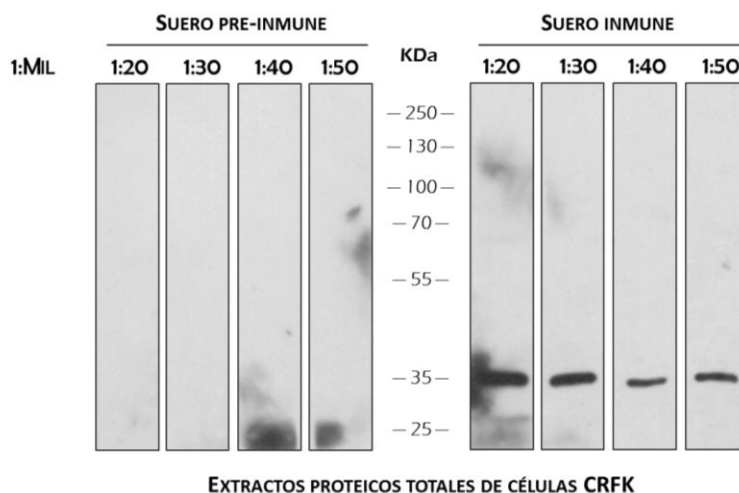
La identidad de la rAnxA2 expresada se verifico mediante su corrimiento en gel de acrilamida al 10% para, por una parte ser teñida con azul de coomassie y por otra ser transferida a membrana de nitrocelulosa para su identificación en ensayos tipo WB con un anticuerpo anti-AnxA2 comercial y un anticuerpo anti-His (Fig. 30B). En los tres caso se obtuvo una proteína de aproximadamente 42 kDa, que corresponde con el peso molecular de AnxA2 (36 kDa) más el peso añadido por la cola de histidinas.

La proteína recombinante se expresó en *E. coli* BL21, al pellet obtenido se le añadió buffer de proteínas Laemmli. La muestra se hirvió durante 10 min y se corrió en un gel preparativo al 10%. El gel se tiñó con azul de Coomassie (31A) para ubicar la banda correspondiente a la rAnxA2 y proceder a su escisión. Los fragmentos de gel fueron colocados en un aparato para electroelución convencional. La presencia de la rAnxA2 purificada se corroboró mediante un WB utilizando anticuerpos específicos contra AnxA2 y anti-Histidinas (Fig. 31B).



**FIGURA 31. ELECTROELUCIÓN DE LA rANXA2.** Electroelución se llevó a cabo a 20 V durante toda la noche a 4°C. La rAnxA2 se identificó por WB con el uso de anticuerpos anti-AnxA2 y anti-His.

Para la inmunización se usaron conejos New Zealand, de 2-3 meses (2-3 kg). Se obtuvieron 10 ml de sangre de la oreja para usar como suero preinmune. Las inmunizaciones se realizaron cada 15 días durante 3 meses, previo a cada inmunización se obtuvieron 500  $\mu$ L de suero. Para cada inmunización se utilizaron 75  $\mu$ g de inmunógeno diluido 1:1 v/v con adyuvante Freud. Tras las inmunizaciones el conejo se sacrificó, posterior a la aplicación de anestesia con la ayuda del veterinario en turno. La sangre del animal se obtuvo por punción cardiaca, se dejó reposar durante 1 h a TA, posteriormente se guardó durante toda la noche a 4°C; pasado este tiempo se centrifugó a 2200 rpm durante 10 min a TA. La fase correspondiente al suero se guardó a -20 °C. La especificidad del suero inmune se verificó mediante ensayo tipo WB utilizando extractos de células CrFK sin infectar (Fig. 32).



**FIGURA 32. ANÁLISIS DEL SUERO INMUNE ANTI-ANXA2.** Mediante ensayos tipo WB se corroboró la inmunoespecificidad del anticuerpo policlonal obtenido tras la inmunización. El suero preinmune e inmune se probaron a diluciones de 1:20,000 a 1:50,000.

La proteína recombinante obtenida (rAnxA2) se utilizó para los ensayos de unión a proteína por superposición de virus (VOPBA) y para ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) en gel. El anticuerpo policlonal obtenido se utilizó para ensayos tipo WB.

## **Perspectivas**

Analizar las modificaciones postraduccionales que sufre la AnxA2 durante la replicación del FCV.

Determinar si la asociación de AnxA2 con el RNA viral es directa o indirecta.

Identificar que elementos celulares y virales que participan en la asociación de AnxA2 con la RT 3' del FCV.

Analizar las posibles modificaciones que sufre el citoesqueleto de actina tras la interferencia de AnxA2 y sus efectos sobre la replicación viral.



## Referencias

1. Practice parameter: the management of acute gastroenteritis in young children. American Academy of Pediatrics, Provisional Committee on Quality Improvement, Subcommittee on Acute Gastroenteritis. *Pediatrics*. 1996 Mar;97(3):424-35.
2. Bicer S, Col D, Erdag GC, Giray T, Gurol Y, Yilmaz G, et al. A retrospective analysis of acute gastroenteritis agents in children admitted to a university hospital pediatric emergency unit. *Jundishapur J Microbiol*. 2014 Apr;7(4):e9148.
3. Suárez L, Cano B. Manejo actual de la gastroenteritis aguda (GEA) con soluciones de rehidratación oral. *Nutr clín diet hosp*. 2009;29(2):6-14.
4. WHO. The treatment of diarrhoea. A manual for physicians and other senior health workers. World Health Organization; 2005. p. 44.
5. Hellard ME, Sinclair MI, Harris AH, Kirk M, Fairley CK. Cost of community gastroenteritis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003 Mar;18(3):322-8.
6. Chow CM, Leung AK, Hon KL. Acute gastroenteritis: from guidelines to real life. *Clin Exp Gastroenterol*. 2010;3:97-112.
7. Bresee JS, Marcus R, Venezia RA, Keene WE, Morse D, Thanassi M, et al. The etiology of severe acute gastroenteritis among adults visiting emergency departments in the United States. *J Infect Dis*. 2012 May 01;205(9):1374-81.
8. Oldak E, Sulik A, Rozkiewicz D, Liwoch-Nienartowicz N. Norovirus infections in children under 5 years of age hospitalized due to the acute viral gastroenteritis in northeastern Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Jul 6.
9. Doerflinger SY, Weichert S, Koromyslova A, Chan M, Schwerk C, Adam R, et al. Human Norovirus Evolution in a Chronically Infected Host. *mSphere*. 2017 Mar-Apr;2(2).
10. Lee N, Chan MC, Wong B, Choi KW, Sin W, Lui G, et al. Fecal viral concentration and diarrhea in norovirus gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*. 2007 Sep;13(9):1399-401.
11. Simmonds P, Karakasiliotis I, Bailey D, Chaudhry Y, Evans DJ, Goodfellow IG. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res*. 2008 May;36(8):2530-46.
12. Radford AD, Coyne KP, Dawson S, Porter CJ, Gaskell RM. Feline calicivirus. *Vet Res*. 2007 Mar-Apr;38(2):319-35.
13. Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis*. 2000 May;181 Suppl 2:S322-30.
14. Clarke IN, Estes, M.K., Green, K.Y., Hansman, G.S., Knowles, N.J., Koopmans, M.K., Matson, D.O., Meyers, G., Neill, J.D., Radford, A., Smith, A.W., Studdert, M.J., Thiel, H.-J. and Vinjé, J. Caliciviridae, Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. Springer-Verlag. 2012;Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses:977–86.
15. Bae J, Schwab KJ. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Jan;74(2):477-84.
16. Kapikian AZ. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J Infect Dis*. 2000 May;181 Suppl 2:S295-302.

17. Schwartz S, Vergoulidou M, Schreier E, Loddenkemper C, Reinwald M, Schmidt-Hieber M, et al. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011 Jun 2;117(22):5850-6.
18. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Jan;14(1):15-37.
19. Vashist S, Bailey D, Putics A, Goodfellow I. Model systems for the study of human norovirus Biology. *Future Virol*. 2009 Jul;4(4):353-67.
20. Jones MK, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes LR, Grau KR, et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science*. 2014 Nov 07;346(6210):755-9.
21. Lei S, Samuel H, Twitchell E, Bui T, Ramesh A, Wen K, et al. *Enterobacter cloacae* inhibits human norovirus infectivity in gnotobiotic pigs. *Sci Rep*. 2016 Apr 26;6:25017.
22. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*. 2016 Sep 23;353(6306):1387-93.
23. Ha S, Choi IS, Choi C, Myoung J. Infection models of human norovirus: challenges and recent progress. *Arch Virol*. 2016 Apr;161(4):779-88.
24. Pesavento PA, MacLachlan NJ, Dillard-Telm L, Grant CK, Hurley KF. Pathologic, immunohistochemical, and electron microscopic findings in naturally occurring virulent systemic feline calicivirus infection in cats. *Vet Pathol*. 2004 May;41(3):257-63.
25. Dawson S, Bennett D, Carter SD, Bennett M, Meanger J, Turner PC, et al. Acute arthritis of cats associated with feline calicivirus infection. *Res Vet Sci*. 1994 Mar;56(2):133-43.
26. Abd-Eldaim M, Potgieter L, Kennedy M. Genetic analysis of feline caliciviruses associated with a hemorrhagic-like disease. *J Vet Diagn Invest*. 2005 Sep;17(5):420-9.
27. Sosnovtsev S, Green KY. RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity. *Virology*. 1995 Jul 10;210(2):383-90.
28. Royall E, Locker N. Translational Control during Calicivirus Infection. *Viruses*. 2016 Apr 20;8(4):104.
29. Sandoval-Jaime C, Parra GI, Smith AW, Green KY, Sosnovtsev SV. Genetic characterization of a reptilian calicivirus (Cro1). *Virol J*. 2012 Nov 29;9:297.
30. Kaiser WJ, Chaudhry Y, Sosnovtsev SV, Goodfellow IG. Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *J Gen Virol*. 2006 Feb;87(Pt 2):363-8.
31. Marin MS, Casais R, Alonso JM, Parra F. ATP binding and ATPase activities associated with recombinant rabbit hemorrhagic disease virus 2C-like polypeptide. *J Virol*. 2000 Nov;74(22):10846-51.
32. Pfister T, Wimmer E. Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol*. 2001 Feb;75(4):1611-9.
33. Yumiketa Y, Narita T, Inoue Y, Sato G, Kamitani W, Oka T, et al. Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation. *Vet Microbiol*. 2016 Mar 15;185:62-7.
34. Bailey D, Kaiser WJ, Hollinshead M, Moffat K, Chaudhry Y, Wileman T, et al. Feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation. *J Gen Virol*. 2010 Mar;91(Pt 3):739-49.
35. Goodfellow I. The genome-linked protein VPg of vertebrate viruses - a multifaceted protein. *Curr Opin Virol*. 2011 Nov;1(5):355-62.
36. Wei L, Huhn JS, Mory A, Pathak HB, Sosnovtsev SV, Green KY, et al. Proteinase-polymerase precursor as the active form of feline calicivirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*. 2001 Feb;75(3):1211-9.

37. Sosnovtseva SA, Sosnovtsev SV, Green KY. Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J Virol.* 1999 Aug;73(8):6626-33.
38. Carter MJ, Milton ID, Turner PC, Meanger J, Bennett M, Gaskell RM. Identification and sequence determination of the capsid protein gene of feline calicivirus. *Arch Virol.* 1992;122(3-4):223-35.
39. Neill JD, Reardon IM, Heinrichson RL. Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. *J Virol.* 1991 Oct;65(10):5440-7.
40. Sosnovtsev SV, Sosnovtseva SA, Green KY. Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J Virol.* 1998 Apr;72(4):3051-9.
41. Abente EJ, Sosnovtsev SV, Sandoval-Jaime C, Parra GI, Bok K, Green KY. The feline calicivirus leader of the capsid protein is associated with cytopathic effect. *J Virol.* 2013 Mar;87(6):3003-17.
42. Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, Onwudiwe O, Green KY. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol.* 2005 Apr;79(7):4012-24.
43. Kreutz LC, Seal BS, Mengeling WL. Early interaction of feline calicivirus with cells in culture. *Arch Virol.* 1994;136(1-2):19-34.
44. Makino A, Shimojima M, Miyazawa T, Kato K, Tohya Y, Akashi H. Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J Virol.* 2006 May;80(9):4482-90.
45. Pesavento PA, Stokol T, Liu H, van der List DA, Gaffney PM, Parker JS. Distribution of the feline calicivirus receptor junctional adhesion molecule a in feline tissues. *Vet Pathol.* 2011 Mar;48(2):361-8.
46. Stuart AD, Brown TD. Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *J Gen Virol.* 2007 Jan;88(Pt 1):177-86.
47. Stuart AD, Brown TD. Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *J Virol.* 2006 Aug;80(15):7500-9.
48. Kreutz LC, Seal BS. The pathway of feline calicivirus entry. *Virus Res.* 1995 Jan;35(1):63-70.
49. Gamarnik AV, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* 1998 Aug 01;12(15):2293-304.
50. Herbert TP, Brierley I, Brown TD. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation 1997.
51. Willcocks MM, Carter MJ, Roberts LO. Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF4G and inhibition of host-cell protein synthesis during feline calicivirus infection. *J Gen Virol.* 2004 May;85(Pt 5):1125-30.
52. Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, et al. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep.* 2005 Oct;6(10):968-72.
53. Cancio-Lonches C, Yocupicio-Monroy M, Sandoval-Jaime C, Galvan-Mendoza I, Urena L, Vashist S, et al. Nucleolin interacts with the feline calicivirus 3' untranslated region and the protease-polymerase NS6 and NS7 proteins, playing a role in virus replication. *J Virol.* 2011 Aug;85(16):8056-68.
54. Hernandez BA, Sandoval-Jaime C, Sosnovtsev SV, Green KY, Gutierrez-Escolano AL. Nucleolin promotes in vitro translation of feline calicivirus genomic RNA. *Virology.* 2016 Feb;489:51-62.
55. Karakasiliotis I, Vashist S, Bailey D, Abente EJ, Green KY, Roberts LO, et al. Polypyrimidine tract binding protein functions as a negative regulator of feline calicivirus translation. *PLoS One.* 2010;5(3):e9562.
56. Wimmer E, Nomoto A. Molecular biology and cell-free synthesis of poliovirus. *Biologicals.* 1993 Dec;21(4):349-56.

57. Love DN, Sabine M. Electron microscopic observation of feline kidney cells infected with a feline calicivirus. *Arch Virol.* 1975;48(3):213-28.
58. Studdert MJ, O'Shea JD. Ultrastructural studies of the development of feline calicivirus in a feline embryo cell line. *Arch Virol.* 1975;48(4):317-25.
59. Green KY, Mory A, Fogg MH, Weisberg A, Belliot G, Wagner M, et al. Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells. *J Virol.* 2002 Sep;76(17):8582-95.
60. Sosnovtsev SV, Prikhod'ko EA, Belliot G, Cohen JI, Green KY. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Res.* 2003 Jul;94(1):1-10.
61. Natoni A, Kass GE, Carter MJ, Roberts LO. The mitochondrial pathway of apoptosis is triggered during feline calicivirus infection. *J Gen Virol.* 2006 Feb;87(Pt 2):357-61.
62. Al-Molawi N, Beardmore VA, Carter MJ, Kass GE, Roberts LO. Caspase-mediated cleavage of the feline calicivirus capsid protein. *J Gen Virol.* 2003 May;84(Pt 5):1237-44.
63. Siever DA, Erickson HP. Extracellular annexin II. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Nov;29(11):1219-23.
64. Chasserot-Golaz S, Vitale N, Umbrecht-Jenck E, Knight D, Gerke V, Bader MF. Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell.* 2005 Mar;16(3):1108-19.
65. Dubois T, Oudinet JP, Mira JP, Russo-Marie F. Annexins and protein kinases C. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Oct 11;1313(3):290-4.
66. Liu L. Calcium-dependent self-association of annexin II: a possible implication in exocytosis. *Cell Signal.* 1999 May;11(5):317-24.
67. Futter CE, White IJ. Annexins and endocytosis. *Traffic.* 2007 Aug;8(8):951-8.
68. Filipenko NR, MacLeod TJ, Yoon CS, Waisman DM. Annexin A2 is a novel RNA-binding protein. *J Biol Chem.* 2004 Mar 5;279(10):8723-31.
69. Waisman DM. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem.* 1995 Aug-Sep;149-150:301-22.
70. Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, Waisman D. Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci.* 2013;14(3):6259-305.
71. Glenney JR, Jr., Tack BF. Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Dec;82(23):7884-8.
72. He KL, Deora AB, Xiong H, Ling Q, Weksler BB, Niesvizky R, et al. Endothelial cell annexin A2 regulates polyubiquitination and degradation of its binding partner S100A10/p11. *J Biol Chem.* 2008 Jul 11;283(28):19192-200.
73. Zibouche M, Vincent M, Illien F, Gallay J, Ayala-Sanmartin J. The N-terminal domain of annexin 2 serves as a secondary binding site during membrane bridging. *J Biol Chem.* 2008 Aug 08;283(32):22121-7.
74. Illien F, Finet S, Lambert O, Ayala-Sanmartin J. Different molecular arrangements of the tetrameric annexin 2 modulate the size and dynamics of membrane aggregation. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Sep;1798(9):1790-6.
75. Drucker P, Pejic M, Galla HJ, Gerke V. Lipid segregation and membrane budding induced by the peripheral membrane binding protein annexin A2. *J Biol Chem.* 2013 Aug 23;288(34):24764-76.
76. Gokhale NA, Abraham A, Digman MA, Gratton E, Cho W. Phosphoinositide specificity of and mechanism of lipid domain formation by annexin A2-p11 heterotetramer. *J Biol Chem.* 2005 Dec 30;280(52):42831-40.

77. Valapala M, Maji S, Borejdo J, Vishwanatha JK. Cell surface translocation of annexin A2 facilitates glutamate-induced extracellular proteolysis. *J Biol Chem.* 2014 Jun 06;289(23):15915-26.
78. Deora AB, Kreitzer G, Jacovina AT, Hajjar KA. An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. *J Biol Chem.* 2004 Oct 15;279(42):43411-8.
79. Bellagamba C, Hubaishy I, Bjorge JD, Fitzpatrick SL, Fujita DJ, Waisman DM. Tyrosine phosphorylation of annexin II tetramer is stimulated by membrane binding. *J Biol Chem.* 1997 Feb 07;272(6):3195-9.
80. Chung CY, Erickson HP. Cell surface annexin II is a high affinity receptor for the alternatively spliced segment of tenascin-C. *J Cell Biol.* 1994 Jul;126(2):539-48.
81. Chung CY, Murphy-Ullrich JE, Erickson HP. Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. *Mol Biol Cell.* 1996 Jun;7(6):883-92.
82. Cesarman GM, Guevara CA, Hajjar KA. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J Biol Chem.* 1994 Aug 19;269(33):21198-203.
83. Kassam G, Choi KS, Ghuman J, Kang HM, Fitzpatrick SL, Zackson T, et al. The role of annexin II tetramer in the activation of plasminogen. *J Biol Chem.* 1998 Feb 20;273(8):4790-9.
84. Hajjar KA, Mauri L, Jacovina AT, Zhong F, Mirza UA, Padovan JC, et al. Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine. *J Biol Chem.* 1998 Apr 17;273(16):9987-93.
85. Creutz CE, Snyder SL. Interactions of annexins with the mu subunits of the clathrin assembly proteins. *Biochemistry.* 2005 Oct 25;44(42):13795-806.
86. Zobiack N, Rescher U, Ludwig C, Zeuschner D, Gerke V. The annexin 2/S100A10 complex controls the distribution of transferrin receptor-containing recycling endosomes. *Mol Biol Cell.* 2003 Dec;14(12):4896-908.
87. Morel E, Gruenberg J. The p11/S100A10 light chain of annexin A2 is dispensable for annexin A2 association to endosomes and functions in endosomal transport. *PLoS One.* 2007;2(10):e1118.
88. Jost M, Zeuschner D, Seemann J, Weber K, Gerke V. Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca<sup>2+</sup> is not required for the association of annexin II with early endosomes. *J Cell Sci.* 1997 Jan;110 ( Pt 2):221-8.
89. Filipenko NR, Waisman DM. The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem.* 2001 Feb 16;276(7):5310-5.
90. Gerke V, Weber K. Identity of p36K phosphorylated upon Rous sarcoma virus transformation with a protein purified from brush borders; calcium-dependent binding to non-erythroid spectrin and F-actin. *EMBO J.* 1984 Jan;3(1):227-33.
91. Hayes MJ, Shao DM, Bailly M, Moss SE. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *Embo Journal.* 2006 May 3;25(9):1816-26.
92. Oliferenko S, Paiha K, Harder T, Gerke V, Schwarzler C, Schwarz H, et al. Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 1999 Aug 23;146(4):843-54.
93. Thiel C, Osborn M, Gerke V. The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca(2+)-binding sites. *J Cell Sci.* 1992 Nov;103 ( Pt 3):733-42.
94. Mickleburgh I, Burtle B, Hollas H, Campbell G, Chrzanowska-Lightowlers Z, Vedeler A, et al. Annexin A2 binds to the localization signal in the 3' untranslated region of c-myc mRNA. *FEBS J.* 2005 Jan;272(2):413-21.

95. Hollas H, Aukrust I, Grimmer S, Strand E, Flatmark T, Vedeler A. Annexin A2 recognises a specific region in the 3'-UTR of its cognate messenger RNA. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Nov;1763(11):1325-34.
96. Aukrust I, Hollas H, Strand E, Evensen L, Trave G, Flatmark T, et al. The mRNA-binding site of annexin A2 resides in helices C-D of its domain IV. *J Mol Biol*. 2007 May 18;368(5):1367-78.
97. Sharathchandra A, Lal R, Khan D, Das S. Annexin A2 and PSF proteins interact with p53 IRES and regulate translation of p53 mRNA. *RNA Biol*. 2012 Dec;9(12):1429-39.
98. Wright JF, Kurosky A, Wasi S. An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Feb 15;198(3):983-9.
99. Wright JF, Kurosky A, Pryzdial EL, Wasi S. Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts. *J Virol*. 1995 Aug;69(8):4784-91.
100. Pietropaolo RL, Compton T. Direct interaction between human cytomegalovirus glycoprotein B and cellular annexin II. *J Virol*. 1997 Dec;71(12):9803-7.
101. Yang SL, Chou YT, Wu CN, Ho MS. Annexin II binds to capsid protein VP1 of enterovirus 71 and enhances viral infectivity. *J Virol*. 2011 Nov;85(22):11809-20.
102. Dziduszko A, Ozbun MA. Annexin A2 and S100A10 regulate human papillomavirus type 16 entry and intracellular trafficking in human keratinocytes. *J Virol*. 2013 Jul;87(13):7502-15.
103. Woodham AW, Da Silva DM, Skeate JG, Raff AB, Ambroso MR, Brand HE, et al. The S100A10 subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection. *PLoS One*. 2012;7(8):e43519.
104. Ma G, Greenwell-Wild T, Lei K, Jin W, Swisher J, Hardegen N, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection. *J Exp Med*. 2004 Nov 15;200(10):1337-46.
105. Woodham AW, Sanna AM, Taylor JR, Skeate JG, Da Silva DM, Dekker LV, et al. Annexin A2 antibodies but not inhibitors of the annexin A2 heterotetramer impair productive HIV-1 infection of macrophages in vitro. *Virol J*. 2016 Nov 18;13(1):187.
106. Ryzhova EV, Vos RM, Albright AV, Harrist AV, Harvey T, González-Scarano F. Annexin 2: a Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Binding Protein Involved in Replication in Monocyte-Derived Macrophages. *Journal of Virology*. 2006 March 15, 2006;80(6):2694-704.
107. Rai T, Mosoian A, Resh MD. Annexin 2 is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle production but plays a cell type-dependent role in regulating infectivity. *J Virol*. 2010 Oct;84(19):9783-92.
108. Krawczyk E, Suprynowicz FA, Hebert JD, Kamonjoh CM, Schlegel R. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein translocates calpactin I to the perinuclear region. *J Virol*. 2011 Nov;85(21):10968-75.
109. Kwak H, Park MW, Jeong S. Annexin A2 binds RNA and reduces the frameshifting efficiency of infectious bronchitis virus. *PLoS One*. 2011;6(8):e24067.
110. Backes P, Quinkert D, Reiss S, Binder M, Zayas M, Rescher U, et al. Role of annexin A2 in the production of infectious hepatitis C virus particles. *J Virol*. 2010 Jun;84(11):5775-89.
111. Saxena V, Lai CK, Chao TC, Jeng KS, Lai MM. Annexin A2 is involved in the formation of hepatitis C virus replication complex on the lipid raft. *J Virol*. 2012 Apr;86(8):4139-50.
112. Sheng C, Liu X, Jiang Q, Xu B, Zhou C, Wang Y, et al. Annexin A2 is involved in the production of classical swine fever virus infectious particles. *J Gen Virol*. 2015 May;96(Pt 5):1027-32.
113. Santos-Valencia JC. Participación del a proteína Anexina A2 en la replicación del calicivirus felino. México: CINVESTAV-IPN; 2012.

114. Luo M, Hajjar KA. Annexin A2 system in human biology: cell surface and beyond. *Semin Thromb Hemost.* 2013 Jun;39(4):338-46.
115. Chiang Y, Schneiderman MH, Vishwanatha JK. Annexin II expression is regulated during mammalian cell cycle. *Cancer Res.* 1993 Dec 15;53(24):6017-21.
116. Wang CY, Lin CF. Annexin A2: its molecular regulation and cellular expression in cancer development. *Dis Markers.* 2014;2014:308976.
117. Lai CK, Jeng KS, Machida K, Lai MM. Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A. *J Virol.* 2008 Sep;82(17):8838-48.
118. Vedeler A, Hollas H. Annexin II is associated with mRNAs which may constitute a distinct subpopulation. *Biochem J.* 2000 Jun 15;348 Pt 3:565-72.