



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

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR**

# Participación de la proteína celular p53 en el ciclo replicativo del Calicivirus felino

TESIS

QUE PRESENTA:

M. en C. ADRIAN TRUJILLO USCANGA

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 DE 2020

Este trabajo se realizó en el laboratorio número 9 de virología del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano<sup>1</sup> y la asesoría de la Dra. Rosa María del Ángel<sup>1</sup>; Dr. Juan Ernesto Ludert León<sup>1</sup>; Dr. José Tapia Ramírez<sup>2</sup> y el Dr. Carlos Sandoval Jaime<sup>3</sup>.

Un agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo de doctorado.

<sup>1</sup> Departamento de infectómica y patogénesis molecular

<sup>2</sup> Departamento de genética y biología molecular

<sup>3</sup> Instituto de biotecnología IBT-UNAM

## **Agradecimientos**

Agradezco de todo corazón a la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano por haberme formado y por haberme levantado más de una vez.

¡Es un lujo y un honor ser su estudiante!

¡Gracias totales jefa!

Gracias a mis profesores:

Dra. Rosa María del Ángel

Dr. Juan Ludert

Dr. José Tapia

Dr. Carlos Sandoval

Por sus consejos, sus observaciones y sus llamadas de atención.

Agradezco por su apoyo técnico : Dra. Cleotilde Cancio Lonches; Dr. Romel Rosales Ramírez; Dr. José Humberto Pérez Olais; Dr. Bulmaro Cisneros Vega; M. en C. Wendy Lilián Gómez Monsiváis; y Dr. Efraín Garrido Guerrero.

## Dedicatorias

A mis queridos padres:

Lino Trujillo Ramírez

Montserrat Uscanga de la Rosa

Gracias por su apoyo incondicional y por haber creído en mí.

¡Los amo!

A mi hermano:

Jose Aldo Trujillo Uscanga

¡Te amo hermano!

A mis abuelos:

Rafael Uscanga Loyo

Victor Trujillo<sup>†</sup>

Carmen de la Rosa Ordaz

Juana Ramírez<sup>†</sup>

Gracias por su apoyo incondicional.

## Contenido

Resumen .....	6
Abstract .....	7
Introducción .....	8
• Generalidades del calicivirus felino .....	11
• Ciclo replicativo del calicivirus felino .....	14
• Apoptosis inducida por el calicivirus felino .....	18
Antecedentes	
• p53 .....	19
Justificación .....	23
Hipótesis .....	24
Objetivo general .....	24
Objetivos específicos .....	24
Estrategia experimental .....	24
Materiales y métodos	
• Cultivos celulares y stock viral .....	26
• Ensayos de <i>western blot</i> .....	26
• Ensayos de <i>far western blot</i> .....	27
• Ensayos de <i>pull down</i> .....	29
• Ensayos de <i>overlay</i> .....	29
• Ensayos de silenciamiento de p53 .....	30
• Ensayos de viabilidad y proliferación celular .....	30
• Ensayos de inmunofluorescencia .....	31

- Ensayos de ligación por proximidad .....32
- Ensayos *in silico* de interacción proteína-proteína .....33
- Análisis estadísticos .....33

Resultados

- Los niveles de expresión y la localización subcelular de p53 no cambian en las células infectadas con FCV .....34
- p53 interacciona con VP1 de FCV en células infectadas .....38
- p53 se asocia al RNA de doble cadena en células infectadas .....47
- p53 se asocia a la proteasa-polimerasa del FCV .....51
- El silenciamiento de p53 resulta en el retraso del efecto citopático y reducción de proteína y progenie viral .....53

Discusión .....57

Conclusiones .....63

Perspectivas .....64

Referencias .....65

## Resumen

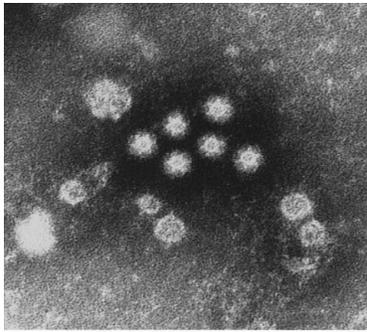
La proteína celular p53 es un factor de transcripción implicado en el arresto del ciclo celular, diferenciación, senescencia y apoptosis. Durante las infecciones virales, p53 puede ser regulada: en algunos casos se activa o inactiva, mientras que en otros puede ser regulada diferencialmente durante las diferentes etapas del ciclo replicativo viral. Aunque durante la infección por calicivirus, la apoptosis es importante para la salida del virus y para su propagación en el hospedero, no hay reportes de la participación de p53 en la replicación de FCV. En este trabajo demostramos mediante ensayos *in vitro* e *in situ* en células infectadas que p53 interacciona con la proteína viral mayoritaria de la cápside (VP1), la proteasa-polimerasa y con el RNA de doble cadena (RNA<sub>dc</sub>) del FCV. Esta asociación de p53 con elementos virales sugiere que p53 participa en la replicación viral. El silenciamiento de p53 en células CrFK infectadas con FCV, utilizando RNAs de interferencia, resultó en una menor expresión de la proteína no estructural NS6/7 y en menor progenie viral infecciosa. Estos resultados indican que p53 participa y es necesaria para la replicación eficiente de FCV.

## **Abstract**

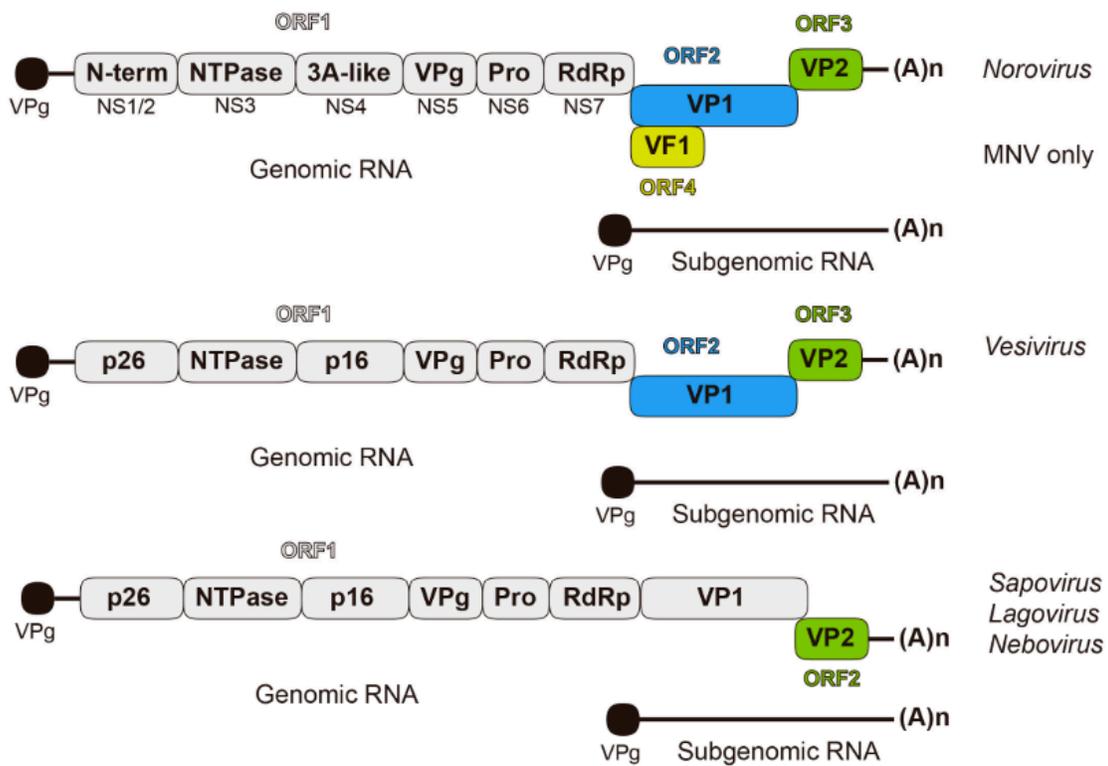
p53 is a host cell transcription factor implicated in the induction of cell-cycle arrest, differentiation, senescence, and apoptosis. p53 can be also activated and regulated by viral infections, as has been widely reported. Some viruses activate p53, others induce its inactivation, and in some other cases, this protein is differentially modulated during the different stages of the replicative cycle. Even though during calicivirus infections apoptosis is required for the virus exit and spread into the host, no reports regarding the role of p53 in the FCV replicative cycle have been described. Here we found that p53 associates with the mayor viral capsid protein (VP1), the protease-polymerase and the double-stranded RNA (dsRNA), suggesting that p53 participates in the FCV replication. The knock-down of p53 expression in CrFK cells prior to infection with FCV resulted in a strong reduction of the non-structural protein NS6/7 expression levels, and a decrease of the viral progeny production. Taken together, these results indicate that p53 participates in the FCV replication cycle.

## Introducción

La familia *Caliciviridae* está formada por virus que infectan a una gran variedad de vertebrados y causan una enorme gama de síntomas gastrointestinales, respiratorios, hemorrágicos y vesiculares. Esta familia está compuesta por once géneros: *Lagovirus*, *Norovirus*, *Nebovirus*, *Recovirus*, *Sapovirus*, *Valovirus*, *Vesivirus*, *Bavovirus*, *Nacovirus*, *Minovirus* y *Salovirus* (Vinjé et al., 2019) y debe su nombre al fenotipo de copas o cálices en la superficie del virión observadas por microscopía electrónica (**Figura 1**) (Bishop & Kirkwood, 2008) (Clarke & Lambden, 1997). Los calicivirus poseen un RNA genómico (RNAg) de cadena sencilla y de polaridad positiva altamente conservado en secuencia y estructura, con un tamaño aproximado de 6.4 a 8.5 Kilobases (Kbs) (Clarke & Lambden, 1997) (Clarke & Lambden, 2000) (Alhatlani, Vashist, & Goodfellow, 2015) (Vinjé et al., 2019), el cual está covalentemente unido en el extremo 5' a la proteína genómica viral (VPg) (Herbert, Brierley, & Brown, 1997) y poliadenilado en el extremo 3' (**Figura 2**) (Herbert et al., 1997) (Herbert et al., 1997) (Alhatlani et al., 2015). Los RNAg de los miembros de esta familia poseen dos distintas organizaciones genómicas: algunos como los miembros de los géneros *Sapovirus*, *Lagovirus* y *Nebovirus* poseen dos marcos de lectura abiertos mientras que otros, como los *Vesivirus* y *Norovirus* presentan tres marcos de lectura abiertos (Royall & Locker, 2016). Particularmente, en el caso del *Norovirus Murino* (MNV) hay un cuarto marco de lectura (ORF4) sobrelapado en el ORF2, que codifica para el factor de virulencia 1 (VF1) (McFadden et al., 2011).



**Figura 1.** Microscopía electrónica de Calicivirus humanos orientados en su eje de simetría, que muestran la clásica morfología de estrella de David (Clarke & Lambden, 1997).



**Figura 2.** Representación esquemática de la organización genómica de los géneros más representativos de la familia *Caliciviridae*. Obtenido de (Royall & Locker, 2016).

En los géneros *Norovirus* y *Sapovirus* se encuentran clasificados los virus que infectan humanos y que son la principal causa de gastroenteritis no bacteriana en niños y adultos en países desarrollados y en vías de desarrollo (Mawatari & Kato, 2014) (Thorne & Goodfellow, 2014). Estos patógenos son altamente contagiosos y ocasionan una sintomatología severa que generalmente es autolimitante (diarreas, vómitos, calambre en el abdomen, fiebre, cefalea y mialgias), pero en grupos vulnerables como niños, adultos mayores, viajeros, soldados y pacientes inmunocomprometidos resulta grave y puede ser letal (Mawatari & Kato, 2014).

A pesar de la importancia médica y de salud pública de estos virus, su estudio ha sido obstaculizado por la falta de un modelo animal y/o cultivos celulares que permitan su replicación. Los modelos de estudio de los calicivirus que infectan a humanos, como las células B y los enteroides derivados de células troncales, permiten la replicación de Norovirus humanos, aunque de manera muy poco eficiente, resultando poco viables para el desarrollo de ensayos de infección en cultivos celulares (Bhar & Jones, 2019), por lo cual se usan como modelos para el estudio de la biología de esta familia al MNV , Calicivirus felino (FCV), Sapovirus porcino (SaP) y el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) para estudiar la patogénesis, inmunopatogénesis y biología viral (Peñaflor-téllez, Trujillo-uscanga, Escobar-almazán, & Gutiérrez-escolano, 2019).

## Generalidades del calicivirus felino

El *Calicivirus felino* (FCV por sus siglas en inglés *Feline calicivirus*) pertenece al género vesivirus. Es un agente infeccioso altamente contagioso que ocasiona enfermedad respiratoria sistémica, estomatitis vesicular y en ocasiones neumonía en gatos domésticos y silvestres (Radford, Coyne, Dawson, Porter, & Gaskell, 2007) (Seal, Ridpath, & Mengeling, 1993). Este virus típicamente ocasiona una enfermedad moderada y autolimitante en el tracto respiratorio superior con presencia de úlceras en la cavidad oral. Sin embargo, algunas cepas inducen fatiga y recientemente se han detectado aislados de cepas de mayor virulencia.

Debido a la disponibilidad de un sistema de cultivo celular que permite la propagación del FCV y al desarrollo de sistemas de genética reversa, resulta un buen modelo para el estudio de la biología de la replicación de los virus de esta familia y su interacción con su hospedero (Crandell, Fabricant, & Nelson-Rees, 1973) (Sosnovtsev & Green, 1995).

El FCV posee un RNA genómico (RNAg) de cadena sencilla, polaridad positiva y un tamaño de 7.7 kilobases (Kb). El genoma está unido covalentemente a la proteína viral VPg en su extremo 5', poliadenilado en el extremo 3' y codifica para tres marcos de lectura abiertos (ORFs) (Radford et al., 2007).

El ORF1 presente en el RNAg de FCV codifica por una poliproteína que es posteriormente procesada para dar origen a seis proteínas no estructurales (NS1-NS6/7). Aunque el RNAg también cuenta con la secuencia codificante de los marcos de lectura 2 y 3 (ORF2 y ORF3 respectivamente) que da lugar a las

proteínas estructurales del virión, estas se expresan normalmente a partir de un RNA subgenómico (RNAsg) que corresponde a la región terminal 3' del RNAg (**Figura 2**). Sin embargo, recientemente se ha reportado que la proteína VP1 codificada en el ORF2 se expresa en bajos niveles a partir del RNAg (Urban, Luttermann, Immunologie, & Riems, 2020).

La expresión del ORF1 da como resultado la expresión de una poliproteína de aproximadamente 200 KDa (Green et al., 2002) que es procesada cotraduccionalmente por el dominio de la proteasa viral codificada en el mismo marco de lectura en los sitios: E<sup>960</sup>-A<sup>961</sup>, E<sup>1071</sup>-S<sup>1072</sup>, E<sup>1345</sup>-T<sup>1346</sup>, and E<sup>1419</sup>-G<sup>1420</sup> en la región C-terminal de la poliproteína (Sosnovtseva, Sosnovtsev, & Green, 1999) y los sitios: E<sup>46</sup>-A<sup>47</sup>, E<sup>331</sup>-D<sup>332</sup> y E<sup>685</sup>-N<sup>686</sup> en la región N-terminal, dando lugar a seis proteínas no estructurales con pesos moleculares de 5.6, 32, 38.9, 30.1, 12.7 y 75.7 KDa denominadas p5.6, p32, p39 (NTPasa), p30, p13 (VPg) y p76 (Pro-Pol) respectivamente (Sosnovtsev, Garfield, & Green, 2002). Al día de hoy, la nomenclatura más usada para referirse a las proteínas no estructurales corresponde a NS1 para p5.6, NS2 para p32, NS3 para p39 que corresponde a una NTPasa putativa, NS4 para p30, NS5 o VPg para p13 y NS6/7 para (Pro-Pol) que corresponde a la proteasa y RNA polimerasa dependiente de RNA.

Las proteínas NS2, NS3 y NS4 participan en la formación de los complejos de replicación (Bailey et al., 2010). Así mismo, NS2 o p32 tiene la capacidad de interactuar con NS3, NS6/7 y de formar multímeros en los complejos de replicación (CR), sugiriendo una participación en la replicación viral (Kaiser, Chaudhry, Sosnovtsev, & Goodfellow, 2006). La proteína NS3 corresponde a una proteína con motivos de NTPasa, sugiriendo que esta proteína corresponde a la

helicasa del RNAg viral (Yumiketa et al., 2016). Así mismo, NS3 participa en la evasión de la respuesta inmune mediante la supresión de la síntesis de Interferón tipo 1 (INF-1) que paradójicamente se inducen por el RNA viral de doble cadena (RNA<sub>dc</sub>) (Yumiketa et al., 2016).

La proteína NS5 o VPg (del inglés: *viral genomic protein*) está unida covalentemente al extremo 5' del RNAg y RNA<sub>sg</sub>, promoviendo la traducción eficiente de ambos RNAs por un mecanismo independiente de Cap (Herbert et al., 1997) en donde VPg participa en la formación de los complejos de inicio de la traducción y recluta al ribosoma a través de su interacción con distintos factores canónicos de la traducción (Goodfellow et al., 2005).

La proteína NS6/7 corresponde a la proteasa y RNA polimerasa dependiente de RNA y (Pro-Pol) en su forma activa (Wei et al., 2001). El dominio proteasa de NS6/7 tiene la capacidad de inhibir la traducción de la célula hospedera mediante la degradación de factores proteicos como la proteína *poly(A) binding protein* o PABP y los factores del inicio de la traducción eIF4GI y eIF4GII, favoreciendo la traducción de las proteínas virales (Goodfellow et al., 2005) (Willcocks, Carter, & Roberts, 2004) (Willcocks et al., 2004).

La expresión de las proteínas estructurales, mayoritaria y minoritaria de la cápside VP1 y VP2 se lleva a cabo principalmente a partir del RNA<sub>sg</sub> de 2.4 Kb (Neill, Reardon, & Heinrikson, 1991), y en menores niveles VP1 se expresa a partir del ORF1 (Urban et al., 2020). El ORF2, codifica al precursor de la proteína de la cápside VP1, que posteriormente es procesado para producir las proteínas estructurales de la cápside VP1 madura y la proteína líder de la cápside o LC implicada en el efecto citopático producido por la infección del FCV (Sosnovtsev,

Sosnovtseva, & Green, 1998) (Abente et al., 2013). Se ha determinado que la proteína mayoritaria de la cápside tiene la capacidad de autoensamblarse y formar partículas similares a virus o *virus like particles* (VLP's) con un elevado potencial inmunogénico (Barbara Di Martino, Marsilio, & Roy, 2007).

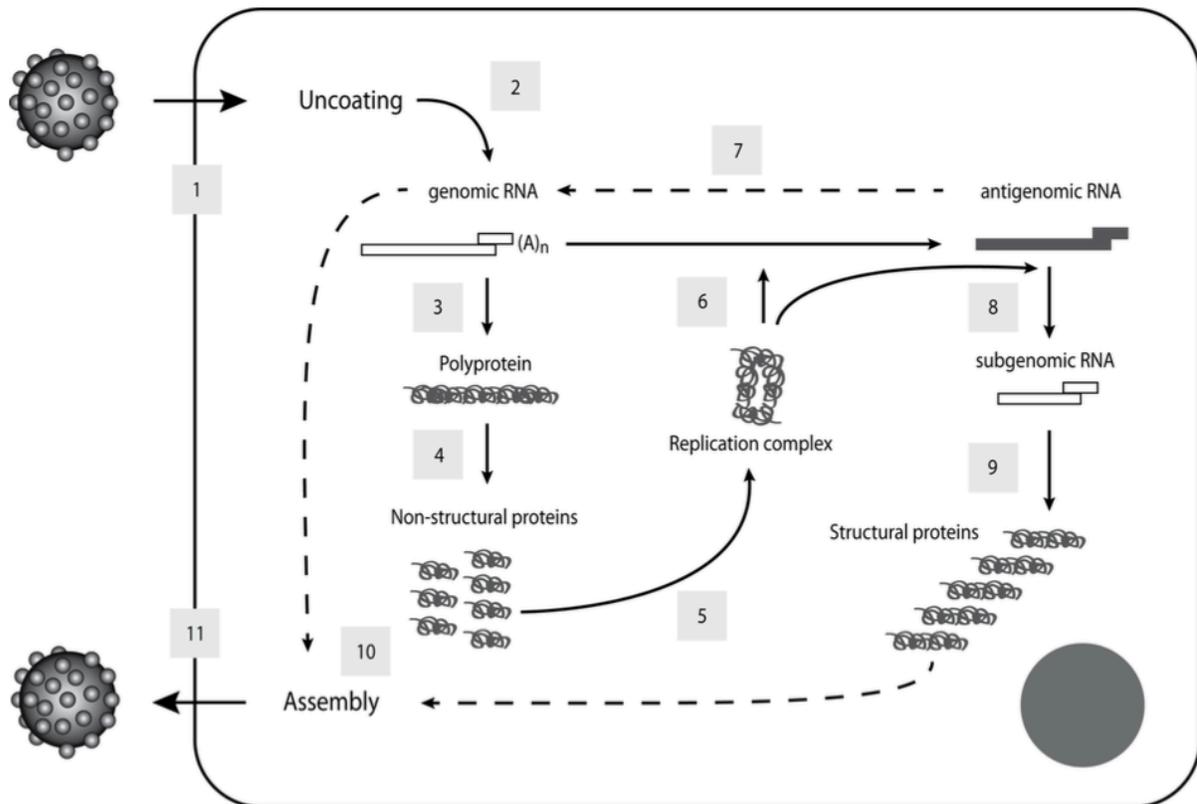
La expresión de la proteína estructural minoritaria de la cápside VP2 se lleva a cabo mediante la expresión del ORF3 codificada en el RNAG (Herbert, Brierley, & Brown, 1996). Se ha reportado que VP2 es necesaria para el ensamblaje y formación de las VLPs (B. Di Martino & Marsilio, 2010) y mediante ensayos de bioinformática se ha sugerido que la proteína VP2 forma un “canal” que permitiría la liberación del RNAG de FCV de la membrana endosomal y así permitir su traducción y posterior replicación (Conley et al., 2019).

### **Ciclo Replicativo del FCV**

El ciclo replicativo del FCV inicia con la interacción de la partícula viral con moléculas de ácido 2,6-siálico (Stuart & Brown, 2007) y la molécula de adhesión JAM-1 (por sus siglas en inglés: *junctional adhesion molecule 1*) (JAM-1) presente en las células de felino (Makino et al., 2006) y su posterior internalización mediante vesículas de clatrina (Xiaodu Wang et al., 2010). Después de la internalización del virión, el genoma viral es liberado al citoplasma, donde se lleva a cabo la traducción de las proteínas virales no estructurales. Esta traducción es mediada por la proteína VPg, la cual funciona como un cap proteinaceo que interactúa con factores canónicos de la traducción como el eIF4E para promover la síntesis de las proteínas no estructurales a partir del RNAG (**Figura 3**) (Goodfellow

et al., 2005). Hoy en día se sabe que además de los factores del inicio de la traducción canónicos, la regulación de la traducción viral requiere de la participación de proteínas celulares denominadas ITAFS (por sus siglas en inglés: *Internal translation associated factors*) que participan en la regulación de la traducción interna de otros virus. Nuestro grupo de trabajo determinó que la proteína celular nucleolina se asocia a la proteasa-polimerasa del FCV y que participa en la replicación viral (Cancio-Lonches et al., 2011) y mediante ensayos de traducción *in vitro* se determinó que nucleolina participa en la traducción dependiente de VPg dando lugar a la síntesis de proteínas virales (Hernández, Sandoval-Jaime, Sosnovtsev, Green, & Gutiérrez-Escolano, 2016). Por otro lado también se ha demostrado que la proteína celular de unión a tractos de polipirimidinas (PTB) modula negativamente la traducción del genoma viral y actúa como un switch para dar lugar a la replicación del RNA genómico mediante su interacción con la región terminal 5' del RNAg (Karakasiliotis et al., 2010). Concomitantemente y como consecuencia de la traducción de las proteínas virales, se lleva a cabo la reorganización de membranas de compartimentos celulares para formar los complejos de replicación y en el caso del FCV las proteínas virales p30, p32 y p39 (NS2, NS3 y NS4 respectivamente) participan en la reorganización de membranas del retículo endoplásmico (Bailey et al., 2010), formando los complejos de replicación (CR) donde se lleva a cabo la síntesis del RNAg y RNAsg (Green et al., 2002). Algunas proteínas celulares como Anexina A2 (AnxA2), que comúnmente tiene una función estructural, también forma parte de los complejos replicativos del FCV. En nuestro grupo de laboratorio se demostró que AnxA2 se asocia al RNA de doble cadena (RNAdc) viral en los

complejos replicativos en células infectadas y mediante ensayos de precipitación *in vitro* de la 3'-UTR del RNAg de FCV la asociación del RNA viral con AnxA2, lo que sugiere que ésta proteína podría participar en algún mecanismo de replicación viral aún no determinado (Santos-Valencia et al., 2019).



**Figura 3.** Representación esquemática del ciclo replicativo de los calicivirus. La replicación viral inicia con la interacción del virión con su receptor en la membrana celular (1), posteriormente es endocitado por vesículas dependientes de clatrina (2), seguido por la traducción y procesamiento de la poliproteína viral (3) dando lugar a las proteínas no estructurales (4). La formación de los complejos replicativos se lleva a cabo por el reacomodo de membranas celulares (5) y se lleva a cabo la replicación del RNA antígenómico (6), que sirve de molde para la síntesis de RNAg (7) o para la síntesis de RNAsg (8). El RNAsg es traducido y da lugar a las proteínas estructurales (9). El RNA sintetizado es traducido de nuevo como en el paso 3 o es empaquetado en partículas virales infecciosas (10), seguido por la liberación de la progenie viral infecciosa. Obtenido y modificado de (Abrantes, Van Der Loo, Le Pendu, & Esteves, 2012).

Se ha observado la presencia de RNA de doble cadena (RNAdc) de longitud que corresponde a los RNAg virales completos en células infectadas con FCV, MNV y virus del león marino de San Miguel (VLMSM), sugiriendo que la replicación viral ocurre mediante un intermediario de RNA de polaridad negativa (también llamado antígenoma) que a su vez sirve como molde para la síntesis de los RNAg y RNAsg de polaridad positiva (Ehresmann & Schaffer, 1977) (Neil & Mengeling, 1988) (Vinjé et al., 2019). Una vez que se sintetiza el RNAsg, este es traducido para dar origen al precursor de la proteína de la cápside VP1, que es posteriormente procesado en las proteínas LC y la VP1 madura a partir del ORF2 y a la proteína VP2 a partir del ORF3. Posterior a la expresión de proteínas LC, VP1 y VP2 ocurre el ensamblaje de las partículas virales, mecanismo aún no bien descrito.

La importancia de la expresión de proteínas como LC radica en la inducción de la apoptosis a través de la regulación negativa de proteínas antiapoptóticas como X-IAP y Survivina para la liberación de la progenie viral y su consecuente diseminación en el hospedero (Barrera-Vázquez, Cancio-Lonches, Hernández-González, et al., 2019). Estos fenómenos de regulación negativa de X-IAP y survivina modulada por LC durante la infección por el FCV, fueron descritos en nuestro grupo de trabajo y correlacionan con el efecto negativo de la sobreexpresión de la proteína survivina en la replicación de FCV (Barrera-Vázquez, Cancio-Lonches, Miguel-Rodríguez, Pérez, & Gutiérrez-Escolano, 2019).

## **Apoptosis inducida por el FCV**

Durante la infección por FCV ocurre el procesamiento proteolítico de proteínas celulares mediante la activación de las caspasas -2,-3, -7,-8 y -9; así como la inducción de cambios celulares característicos de la apoptosis como la translocación de la fosfatidil-serina a la membrana celular externa, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA (Al-Molawi, Beardmore, Carter, Kass, & Roberts, 2003) (Sosnovtsev, Prikhod'ko, Belliot, Cohen, & Green, 2003) (Roberts, Al-Molawi, Carter, & Kass, 2008). Dicho fenómeno apoptótico se ha relacionado con la liberación del citocromo-c de la mitocondria a la región citoplasmática para la posterior activación de caspasa-9 y el procesamiento y activación de la caspasa-3, sugiriendo que la apoptosis es a través de la vía intrínseca o mitocondrial (Natoni, Kass, Carter, & Roberts, 2006).

La apoptosis celular es un evento de muerte celular cuya regulación es esencial para el establecimiento del fenotipo inmunopatogénico de los calicivirus, relacionado a su diseminación en el hospedero [Revisado en: (Peñaflor-téllez et al., 2019)]. Recientemente, la apoptosis en el MNV se ha relacionado con la supresión de la traducción de los genes inducidos por interferón [del inglés: *induced interferon stimulated genes* (ISG)] para reducir la respuesta inmune innata (Emmott et al., 2017), lo cual sugiere que la apoptosis debe ser indispensable en el establecimiento de la infección. Sin embargo, se desconoce la naturaleza de otras moléculas celulares que podrían estar involucradas en este proceso durante la infección.

## **Antecedentes**

### **p53**

Entre los factores celulares más importantes implicados en la apoptosis se encuentra el producto del gen TP53, la proteína p53 (Saha, Kar, & Sa, 2015) o también llamada “el guardián del genoma”, que actúa como un regulador transcripcional. p53 es una proteína multifuncional y entre sus funciones se encuentran: el arresto del ciclo celular, la diferenciación y la senescencia mediante la activación de proteínas reparadoras del DNA (Aloni-Grinstein et al., 2018),(Mishra & Laboratories, 2015).

Canónicamente, la proteína p53 se mantiene en bajos niveles y/o en estado inactivo debido a su interacción con su proteína reguladora MDM2 (mouse double-minute-2), que es la responsable de su poliubiquitinación y posterior degradación a través de la vía proteosomal (Momand, Zambetti, Olson, George, & Levine, 1992). Sin embargo, al existir un daño al DNA por condiciones de estrés a la célula, se induce la perturbación del complejo p53-MDM2, la acumulación de p53 y su posterior activación por modificaciones estructurales y/o postraduccionales (Kasthuber & Lowe, 2017). Una vez activada, p53 induce el arresto del ciclo celular para la reparación del DNA o, cuando el daño es “irreversible” induce la apoptosis para eliminar a las células dañadas. Sin embargo, al día de hoy los mecanismos que influyen la estimulación de una vía o de la otra son materia de investigación (Kasthuber & Lowe, 2017). Aunque la actividad canónica de p53 es la de factor de transcripción de una gran cantidad de genes en respuesta a distintos tipos de estrés, p53 tiene la capacidad de localizarse en la mitocondria,

modificando la permeabilidad de la misma y liberando los factores apoptogénicos (Angelina V. Vaseva; Ute M. Moll, 2010) (Amaral, Xavier, Steer, & Rodrigues, 2010).

Entre las proteínas reguladas por p53 a nivel transcripcional se encuentra el inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CDK) p21, una proteína celular implicada en el arresto del ciclo celular en respuesta a una gran variedad de estímulos; en la regulación de la transcripción; en la modulación o inhibición de la apoptosis y en mecanismos de reparación del DNA (Karimian, Ahmadi, & Yousefi, 2016).

Debido a que p53 puede ser activada por diversas señales de estrés, no es sorpresa que las infecciones virales modifiquen su dinámica y/o estado estacionarios para lograr una replicación eficiente y su propagación en el hospedero (Sato & Tsurumi, 2013) (Aloni-Grinstein et al., 2018).

Algunos virus de RNA como el coronavirus humano NL63 (HCoV-NL63) inducen la degradación de p53 mediante la expresión de una proteasa tipo papaína (Yuan et al., 2015), lo que resulta en una replicación viral más eficiente (Ma-Lauer et al., 2016). Los virus Zika (ZIKV) y del oeste del Nilo (del inglés: West Nile virus o WNV) activan a p53 para facilitar su replicación (Yang et al., 2008). Mientras virus de DNA como Adenovirus, Vaccinia, Tanapox (TPV) y el virus del papiloma (HPV) que tienen ciclos de replicación mas prolongados inhiben su actividad; otros virus como SV40, virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) y virus herpes (HSV-1) activan e inhiben la actividad de p53 de forma diferencial de acuerdo a cada etapa de su ciclo replicativo (**tabla 1**) (Aloni-Grinstein et al., 2018).

Virus que reducen/inhiben p53	Virus que requieren la activación y reducción de p53	Virus que requieren la activación de p53
Adenovirus	SV40	ZIKA
Virus vaccinia	Virus de la influenza A	West Nile virus
Tanapox virus	VIH-1	
Papiloma virus	HSV-1	
Coronavirus		

**Tabla 1.** Principales modificaciones de la dinámica de p53 por diversos virus. Tomado y modificado de (Aloni-Grinstein et al., 2018).

Los virus como parásitos intracelulares obligados requieren de la maquinaria de la célula infectada para su eficiente replicación, por lo cual han desarrollado estrategias para reclutarla y utilizarla a su propio beneficio. Siendo p53 una de las proteínas de gran relevancia en la dinámica celular y que es modificada por virus, no es de sorprenderse que esta se encuentre asociada directa o indirectamente a elementos virales (**Tabla 2**). Por citar un ejemplo, la proteína no estructural 1 (NS1) y la nucleoproteína viral (NP) del virus de la influenza A (VIA) interaccionan con p53 para inhibir su actividad de factor de transcripción y actividad apoptótica (Xiaodu Wang et al., 2010) (Xiaodu Wang et al., 2012).

Como se menciona anteriormente, durante la infección por el FCV, se induce la activación de la apoptosis como mecanismo de salida y disseminación en el hospedero a través de la vía mitocondrial, vía por la cual el factor celular p53 participa activando a nivel de transcripción genes que expresan proteínas que

participan en la activación de la apoptosis y mecánicamente liberando elementos mitocondriales que inducen la activación del apoptosoma a través de su incorporación a la membrana mitocondrial. Algunos virus de RNA con estrategias de replicación similares a FCV inducen cambios en los niveles de expresión de p53 y considerando que no se ha estudiado la participación de esta proteína celular en la replicación de los calicivirus, resulta relevante determinar su participación en la replicación de este virus.

Virus	Proteína viral	Asociación con p53	Función
SV40	Antígeno-T	Se asocia a p53	Progresión a la fase S del ciclo celular
Adenovirus	E1B	Se asocia a p53	Progresión a la etapa S del ciclo celular
Papiloma virus	1) E6 2) E7	1) Interacciona con la E3 ubiquitin ligasa E6AP 2) Se asocia con los elementos de la vía DREAM	1) Degradación de p53 2) Altera la regulación de p53
Vaccinia	B1R cinasa	Hiperfosforilación de p53 y reducción de la acetilación de p53 por p300	Incrementa la ubiquitinación de p53
Tanapoxvirus	TPV142R	Fosforilación de p53	No determinada
Virus zika	Proteína de la cápside	Interacciona con MDM2 e interfiere con la formación del complejo MDM2-p53	Acumula y activa p53
West Nile	Proteína de la cápside	Interfiere con la formación del complejo HDM2-p53	Estabilización de p53 y expresión de Bax
Influenza	Nucleoproteína viral (NP)	1) Asociación de NP con p53 2) NP interacciona con RING-43	Impide la ubiquitinación de p53 mediante MDM2 y estabiliza p53 e induce apoptosis
VIH-1	1) Nef 2) Taf 3) Vif	1) Interacciona con p53 2) Inhibe SIRT1 3) Bloquea la degradación de p53 mediada por	1) Desestabiliza p53 2) Activa vías de p53 por la vía de p21 y Bax 3) Arresta el ciclo celular en

		MDM2 y el exporte de p53	G2
Virus Herpes simplex 1	1) ICP22 2) ICP27	1) Interacciona con p53 2) p53 induce su expresión	1) antagoniza la degradación dependiente de p53 de la proteína viral ICP0 2) Replicación viral

**Tabla 2.** Asociaciones de p53 con proteínas virales y sus implicaciones en sus respectivos ciclos de replicación. Modificado de (Aloni-Grinstein et al., 2018).

## Justificación

p53 es modulada de distintas formas por agentes virales y participa en la regulación de eventos importantes y necesarios para la replicación eficiente tanto de virus de RNA y DNA mediante la asociación a sus proteínas estructurales o no estructurales, de forma directa o indirecta.

La infección por FCV induce apoptosis, la cual favorece la liberación de la progenie, diseminación en el hospedero y evasión de la respuesta inmune. En este proceso de muerte celular, p53 es una proteína importante en la regulación a nivel transcripcional y bioquímico.

La participación de p53 en la replicación de miembros de la familia *Caliciviridae* no ha sido estudiada, por lo cual resulta relevante e importante determinar la participación de p53 en la replicación de FCV.

## **Hipótesis**

La proteína celular p53 participa en la replicación del Calicivirus felino

## **Objetivo general**

Determinar la participación de p53 en la replicación del Calicivirus felino

## **Objetivos específicos**

- Determinar los niveles de expresión y localización celular de p53 en el transcurso de la infección por FCV
- Determinar la asociación de p53 con elementos virales
- Determinar la participación de p53 en el ciclo replicativo del FCV

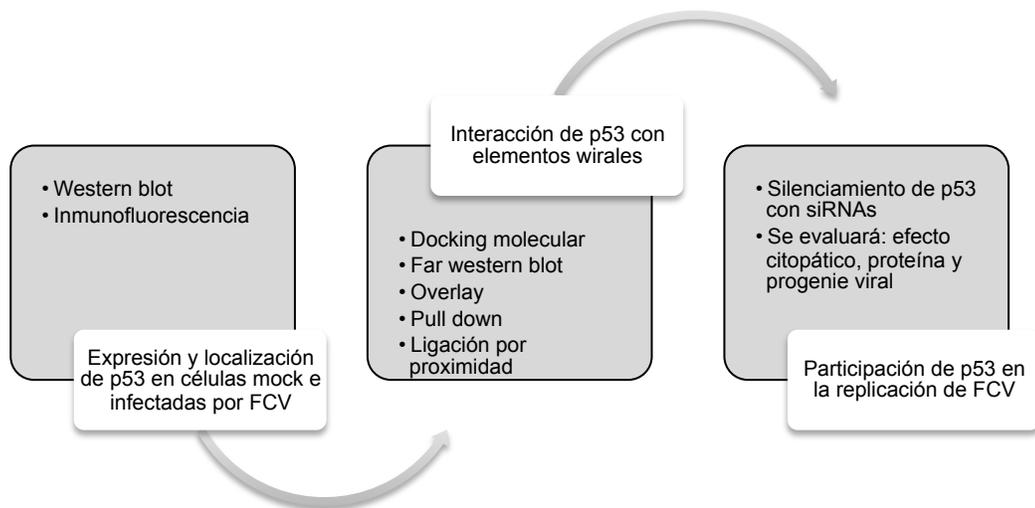
## **Estrategia experimental**

Se evaluaron los niveles de expresión y localización celular de p53 en células Mock e infectadas con FCV en un periodo de 11 horas (que corresponde a la duración aproximada del ciclo replicativo viral) mediante western blot y microscopía confocal respectivamente.

La asociación de p53 con elementos virales se realizó:

- *in silico* por docking molecular
- *in vitro* por ensayos de far western blot, *pull down* y *overlay*
- *in situ* por ensayos de ligación por proximidad

La participación de p53 en la replicación viral se determinó mediante el previo silenciamiento de la proteína p53 con RNAs de interferencia y la posterior infección con FCV. El efecto citopático fue monitoreado por microscopía óptica, los niveles de expresión de las proteínas analizados por western blot y la progenie viral cuantificada por ensayos de plaqueo (**Figura 4**).



**Figura 4. Estrategia experimental.** Representación esquemática de la metodología a usar para realizar cada objetivo establecido.

## **Materiales y métodos**

**Cultivos celulares y stock viral.** Células CrFK (Crandell et al., 1973) obtenidas de la *American type culture collection* (ATCC) fueron cultivadas en medio DEMEM Advanced (Eagle's minimal essential médium) con sales a concentraciones fisiológicas, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1.0mM, amino ácidos no esenciales 0.1mM, bicarbonato de sodio 1.5 g/l, suero fetal bovino al 10%, 5000 U de penicilina y 5 µg/ml of estreptomycin. Las monocapas de los cultivos celulares se mantuvieron al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (Santos-Valencia et al., 2019). La cepa URBANA de Calicivirus felino fue obtenida por genética reversa a partir de la clona infecciosa pQ14 (Sosnovtsev & Green, 1995). Los títulos virales fueron obtenidos por ensayos de plaqueo como ha sido reportado (Escobar-Herrera, Medina-Ramírez, & Gutiérrez-Escolano, 2007).

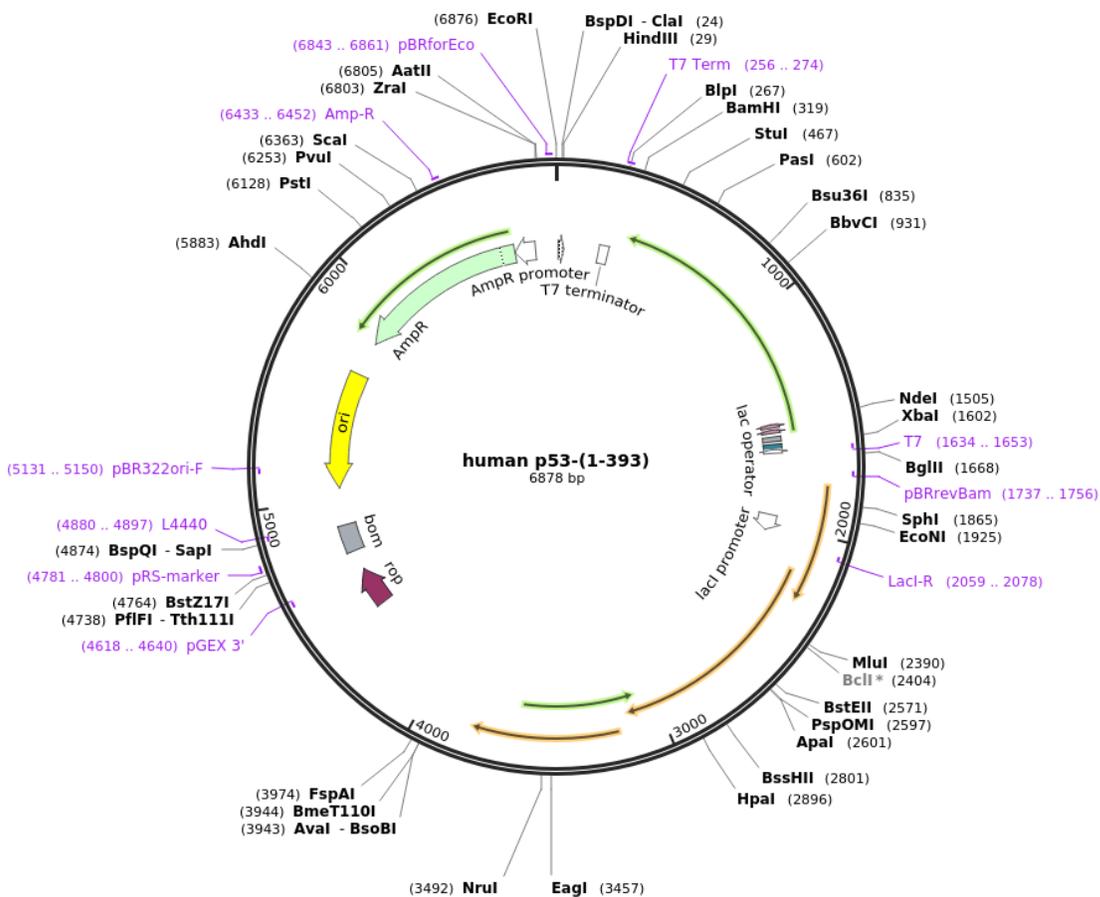
**Ensayos de Western blot.** Células CrFK a una confluencia del 90% fueron infectadas a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 con la cepa URBANA de FCV. Posterior a las 0,1,3,5,7, 9 y 11 horas de la infección, las células fueron lavadas con PBS 1X, lisadas con buffer NP-40 (NaCl 150 mM, NP-40 al 1% y Tris pH 8 al 50 mM) para obtener extractos totales de proteína y posteriormente fueron desnaturalizadas con calor con buffer de Laemlli (SDS al 4%, 20% glicerol al 20%, 2-mercaptoethanol al 10%, azul de bromofenol al 0.004% y Tris-HCl al 125 mM a pH 6.8) por 10 minutos a 94°C. Células no infectadas (mock infected) fueron usadas para determinar los niveles de expresión basal de p53. Posteriormente, los extractos protéicos se sometieron a electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, que fueron transferidos a una membrana de

nitrocelulosa a 4°C a 100 V por 90 minutos. Transferidas las proteínas en la membrana, esta fue bloqueada con leche al 5% en TBS-Tween 0.05% (TBS-T) por 30 minutos a temperatura ambiente. Posterior al bloqueo, se utilizaron los anticuerpos específicos para la detección de cada una de las proteína de interés: anti-p53 hecho en ratón (Sc-374087, Santa Cruz Biotechnology) 1:500 en leche al 5% en TBS-T 1X; como control de infección anti-FCV-NS6/7 hecho en conejo (Donado por el Dr. Ian Goodfellow) 1: 10 000 en leche al 5% en PBS 1X; como control de carga anti-Annexina A2 (AnxA2) hecho en ratón, como se ha reportado (Santos-Valencia et al., 2019); Como control de la actividad de p53, anti-p21 hecho en conejo (SC-397, Santa Cruz Biotechnology) (donado por el Dr. Efraín Garrido) 1:200 en leche al 5% en PBS 1X. Cada anticuerpo fue incubado toda la noche a 4°C y posterior a 3 lavados con TBS-T 1X se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos 1:10 000 en leche al 5% en PBS 1X por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción de quimioluminiscencia se realizó después de 3 lavados con TBS-T 1X, y con el uso del reactivo (PIERCsE). Los niveles de expresión relativa se realizaron con el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

**Ensayo de far western blot.** La proteína p53 recombinante silvestre de *Homo sapiens* fue clonada en el vector de expresión procariota pET15b, Human-p53 (1-393) (Addgene, Cat. 24859) (**figura 5**). La proteína recombinante VP1 de FCV pGEX-VP1 clonada en el vector de expresión procariota pGEX-5X fue expresada siguiendo el protocolo establecido por Paredes-Morales (datos no publicados, tesis de licenciatura). Extractos totales de proteínas de células Mock e infectadas a los tiempos indicados fueron transferidos a una membrana de

nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, bloqueada con leche al 5% en PBS 1X por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron 10  $\mu\text{g}$  de cada proteína recombinante por 4 horas a temperatura ambiente, se lavaron las membranas 3 veces con PBS 1X. Los anticuerpos anti-His (1:5000) y anti-ratón-HRP (1:10,000) se utilizaron para detectar la proteína His-p53. El anticuerpo Anti-GST-HRP (1:500) fue utilizado para detectar VP1-GST de FCV. La detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia como se mencionó anteriormente.

Created with SnapGene®



**Figura 5.** Vector de expresión procariota pET15b de human p53-(1-393) utilizado para expresar la proteína p53-His.

**Ensayo pull down.** Células *Escherichia coli* BL-21 fueron transformadas con 1  $\mu\text{g}$  del plásmido de la construcción pGEX-VP1 (VP1-GST) (Paredes-Morales et al. 2019, tesis de licenciatura). Alcanzada una densidad óptica (DO) igual a 600 ( $A_{600}$ ), se agregó 0.5 mM de IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) para la inducción de la proteína recombinante e incubó en agitación por 4 horas a 37°C; finalmente la proteína VP1-GST fue purificada por electro elución 1 hora a 120 V. Extractos de proteína total de células mock (600  $\mu\text{g}$ ) fueron incubados con 50  $\mu\text{l}$  de perlas de glutatión-agarosa por 2 horas a 4°C en agitación moderada. La mezcla se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos a 4°C y el sobrenadante pre-aclarado se recolectó para añadir una nueva alícuota de 50  $\mu\text{l}$  de perlas de glutatión-agarosa y 10  $\mu\text{g}$  de la proteína recombinante VP1-GST, finalmente se incubaron 2 horas a 4°C en agitación moderada. La mezcla fue centrifugada a 14 000 rpm a 4°C por 5 minutos y las perlas se lavaron 3 veces con PBS 1X a 4°C, y se eluyeron con 20 mM de glutatión reducido (disuelto en 50 mM Tris-HCl pH 8). Los productos eluidos se analizaron por western blot usando los anticuerpos correspondientes. Como control negativo se utilizó 40 $\mu\text{g}$  de la proteína GST en cantidad equimolar de VP1-GST.

**Ensayos de overlay.** Para determinar la interacción directa de p53 con la VP1 de FCV, 5  $\mu\text{g}$  de VP1-GST o GST fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada como se ha mencionado e incubada con 10  $\mu\text{g}$  de p53-His en leche al 5% en PBS1X por 2 horas a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS 1X, la membrana se incubó con el anticuerpo anti-His toda la noche a 4°C en agitación moderada. Después de 3

lavados con PBS 1X, el anticuerpo secundario anti-ratón fue diluido 1: 10 000 en leche al 5% en PBS 1X. La presencia de las proteínas se determinó por quimioluminiscencia.

**Ensayo de silenciamiento de p53.** Para realizar el silenciamiento de p53, las células se transfectaron con los RNAs interferentes como se ha descrito con antelación (Cancio-Lonches et al., 2011). Células CrFKs fueron sembradas en placas de 24 pozos hasta alcanzar una confluencia del 80%. 200 nM de siRNA-No relacionado (QIAGEN) o siRNA-p53 (QIAGEN) y 2.5  $\mu$ l de lipofectamina fueron diluidos en 100  $\mu$ l de medio OPTIMEM por 10 minutos a temperatura ambiente. Las mezclas se combinaron por otros 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se añadió a la monocapa a 37°C durante 8 horas, seguido de la adición de 200  $\mu$ l de medio con suero al 10% hasta alcanzar las 24 horas. Después de la transfección, las monocapas transfectadas con los siRNA-No relacionado o siRNA-p53 se infectaron con FCV a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 durante una hora a 37°C y a las 5 y 7 horas se recolectaron los sobrenadantes y las monocapas se lisaron con buffer Laemmli 1X. Los niveles de p53, FCV NS6/7, GAPDH o AnxA2 fueron determinadas por western blot y la progenie viral mediante ensayos de plaqueo.

**Ensayos de viabilidad y proliferación celular.** Monocapas de células CrFK fueron sembradas en placas de 96 pozos y fueron transfectadas o no con 200 nM de siRNA no relacionado o siRNA-p53 por 24 horas. La viabilidad de las células fue medida con el reactivo Cell Titer 96 AQueous nonradioactive cell proliferation assay (MTS assay, G3580, Promega). La viabilidad celular fue

normalizada en relación a las células control (células no transfectadas y mock-transfectadas). La proliferación celular se midió contando el número de células luego de 24 horas con fenotipo de fibroblasto después de la transfección con los interferentes mencionados con un microscopio Nikon Eclipse Ti-U. El número de células se obtuvo con el software NIS-Elements AR análisis y se comparó el número de células en tres campos distintos en ambas condiciones de transfección.

**Ensayos de inmunofluorescencia.** Células CrFK fueron sembradas en cubreobjetos, y al alcanzar a una confluencia del 95% fueron infectadas o no con FCV a una MOI de 5 por una hora a 37°C. Después de la infección a las 3, 5 y 7 horas las células fueron tratadas con buffer de citoesqueleto (MES 10 mM; NaCl 50 mM; EGTA 0.5 M; MgCl<sub>2</sub> 1M; Glucose 5 mM; pH 6.1) por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) (0.03 gr/ml) por 20 minutos a temperatura ambiente y lavadas 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos; permeabilizadas con PFA-tritón X-100 0.5% por 20 minutos a temperatura ambiente y lavadas 3 veces con PBS 1X. Las monocapas fueron bloqueadas con gelatina al 0.5% (en PBS 1x) por 40 minutos a temperatura ambiente, lavadas 3 veces con PBS 1X y se añadieron los anticuerpos primarios: anti-p53 hecho en conejo (1:300) (Sc-6243, Santa Cruz Biotechnology); anti-FCV VP1 hecho en ratón (1:500) (Sc-80785, Santa Cruz Biotechnology). Ambos anticuerpos primarios fueron diluidos en PBS 1X e incubados *over night* a 4°C. Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos y después fueron incubados con los anticuerpos secundarios: anti-conejo Alexa 488 y anti-ratón Alexa 594 (Invitrogen). Ambos anticuerpos hechos en burro fueron diluidos (1:500) en PBS 1X e incubados 1 hora a

temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS 1X, las muestras se incubaron con 1 mg/ml de DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) por 3 minutos a temperatura ambiente. Finalmente y después de 3 lavados con PBS 1X, las muestras se montaron con glicerol al 90% y fueron analizadas con el microscopio confocal Zeiss LSM-700.

**Ensayo de ligación por proximidad.** Las interacciones de la proteína p53 con la proteína viral de FCV VP1, 3CD (NS6/7) o con el RNA de doble cadena (RNA<sub>dc</sub>) fueron evaluadas con el kit de fluorescencia *in situ Duo Link* (Sigma-Aldrich) en monocapas de células Mock e infectadas con FCV a una MOI de 5 siguiendo el protocolo del producto. Después de las horas indicadas (5 o 7) las células fueron fijadas con PFA por 20 minutos a temperatura ambiente y permeabilizadas con PFA-tritón X-100 0.5% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación con la solución de bloqueo del kit durante una hora y a temperatura ambiente, se incubaron los anticuerpos primarios correspondientes a 4°C toda la noche: anti-p53 hecho en conejo (GTX50438; Gene Tex) y anti-FCV VP1 hecho en ratón, ambos diluidos (1:300) en PBS 1X, anti-dsRNA MAB J2 anti-dsRNA hecho en ratón diluido (1:200) (Soto-Acosta, Bautista-Carbajal, Cervantes-Salazar, Angel-Ambrocio, & del Angel, 2017), anti-p53 hecho en ratón (1:300) y anti-NS6/7 hecho en conejo (1:200). Todos los anticuerpos mencionados fueron diluidos en PBS 1X. Células Mock se incubaron con dos anticuerpos primarios a modo de control biológico; células infectadas con FCV fueron incubadas solo con un anticuerpo primario anti-VP1, anti-p53 o anti-NS6/7 y se usaron como control técnico negativo.

**Análisis *In silico* de interacción proteína-proteína.** La predicción de las estructuras 3D en formato PDB de las proteínas p53, MDM2, y GST [(BAA05653.1 NP\_001009346.1; and XP\_003994894.4) números de acceso de GeneBank] de *Felis catus* fueron obtenidas con el programa RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/StructPredV2/predict/>). La estructura del cristal de la proteína VP1 de FCV (PDB entry 3M8L) fue obtenida del Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>). Para realizar los ensayos de interacción proteína-proteína, los archivos PDB se corrieron en el sitio: “ClusPro protein-protein docking experiments server (<https://cluspro.bu.edu/>)”. Las energías de los modelos obtenidos fueron comparadas con la predicción de interacciones ya reportadas antes: p53-MDM2 como control positivo. Como control negativo se utilizó la predicción p53-GST. Las energías libres (energías de unión) fueron obtenidas por los modelos de interacción hidrofóbica y los valores fueron analizados estadísticamente y comparados. Las estructuras mostradas fueron obtenidas con el software PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, version 2.0; Schrödinger, LLC).

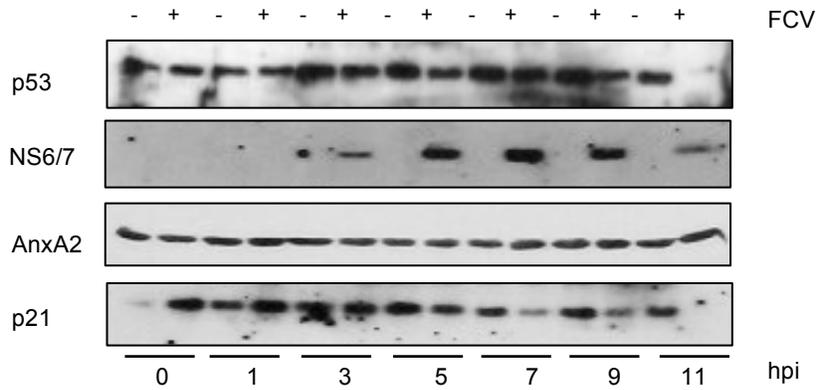
**Análisis estadísticos.** Los análisis fueron realizados usando el software GraphPad Prism 8.4.0 (CA, USA). Análisis de varianza Two-way (ANOVA) fue utilizado. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

## Resultados

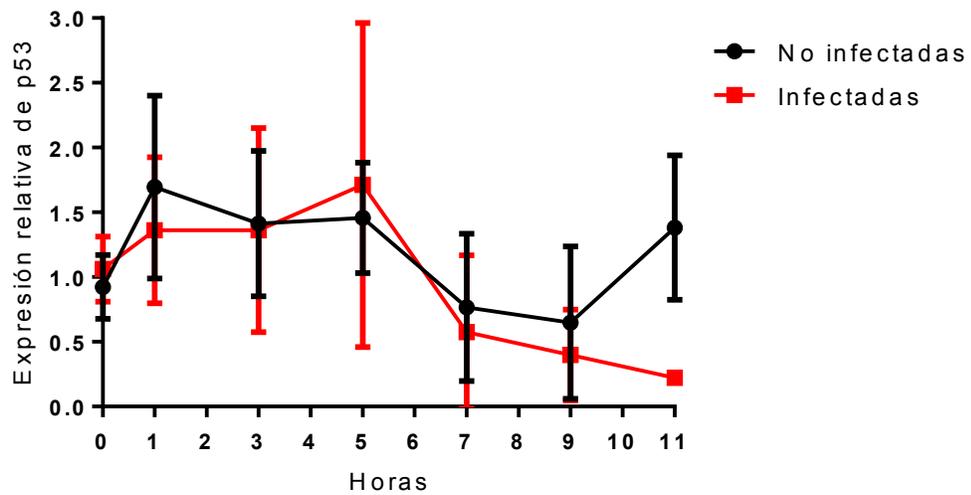
### Los niveles de expresión y la localización subcelular de p53 no cambian en las células infectadas con FCV

Los virus modifican el estado estacionario de p53 cambiando sus niveles de expresión, modulando su actividad, cambiando su localización subcelular y mediante modificaciones postraduccionales (Sato & Tsurumi, 2013) (Aloni-Grinstein et al., 2018). Para determinar posibles cambios en los niveles de expresión y localización subcelular de p53 en células infectadas con FCV, se realizaron ensayos de western blot e inmunofluorescencia respectivamente (**Figura 6 y Figura 7**). Al analizar los niveles de la proteína p53 en los extractos totales de proteína tanto de las células mock como de las infectadas observamos a partir de las 7 hpi una tendencia de reducción de p53 en las células infectadas, aunque no observamos diferencias significativas entre los niveles de esta proteína en los diferentes tiempos de infección analizados (**Figura 6A y Figura 6B**). Esta misma tendencia la observamos cuando realizamos la detección de la proteína p21, una proteína regulada por p53.

**A)**

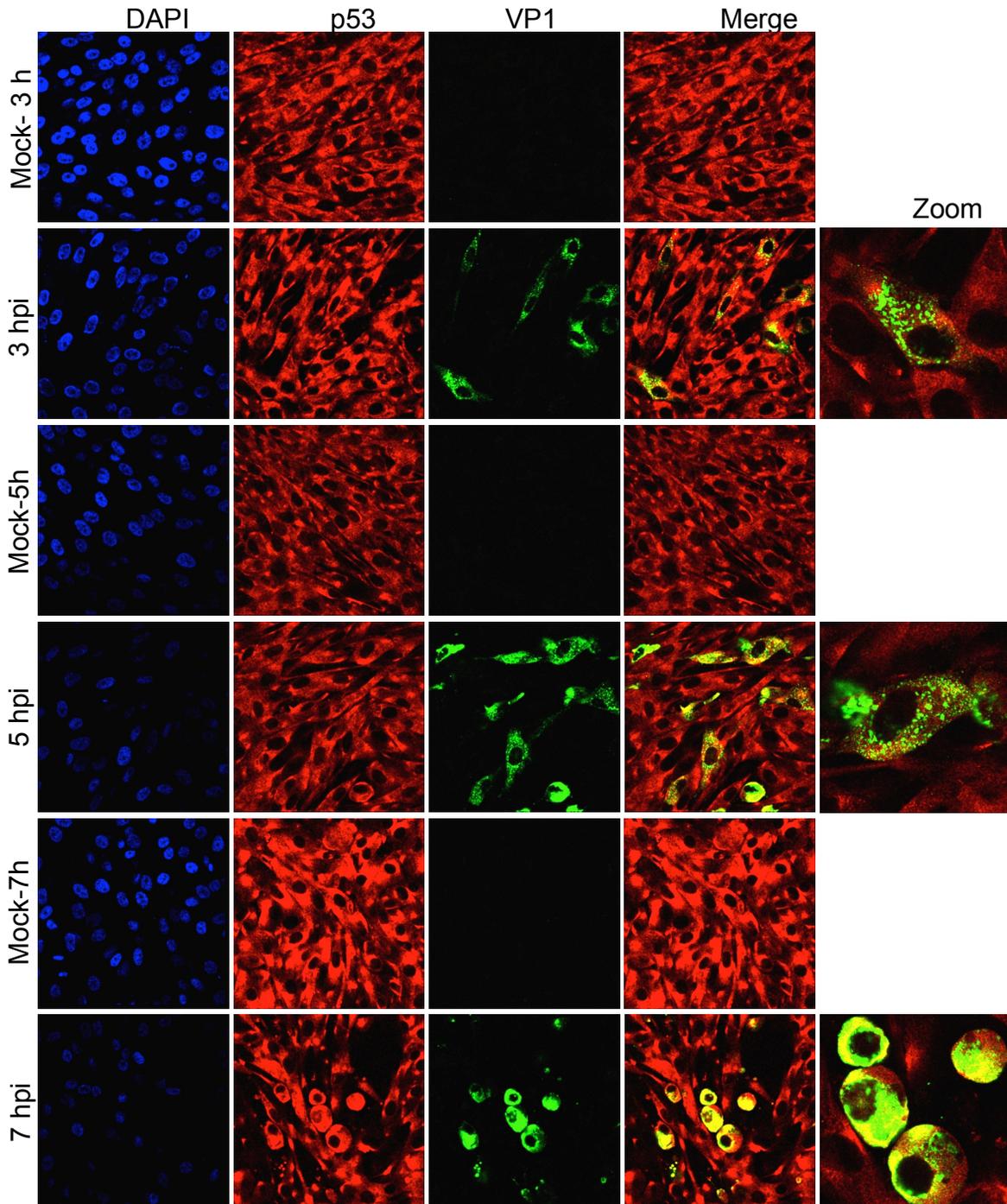


**B)**



**Figura6. A) Niveles de expresión de p53 en células infectadas con FCV.** Extractos totales de Células CrFK Mock (negro) o infectadas (rojo) con FCV a una MOI de 5 por 0, 3, 5, 7, 9 y 11 horas se analizaron por Western blot para determinar los niveles de expresión de p53 en ambas condiciones. NS6/7 corresponde a la proteína viral; AnxA2 fue usado como control de carga. Como control de actividad de p53 se usó p21. **B)** Los niveles de expresión relativa de p53 se cuantificaron usando el software ImageJ. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Asimismo, cuando se analizó la localización celular de p53 en células infectadas o no, por ensayos de inmunofluorescencia, esta se observó principalmente en la región citoplasmática tanto en las células mock como en células infectadas (**Figura 7**). En concordancia con los datos obtenidos por western blot, en los ensayos de inmunofluorescencia analizados por microscopía confocal se observó que la intensidad de la fluorescencia de p53 resultó similar en las condiciones mock e infectadas a las 3, 5 y 7 horas (**Figura 7**). Las cantidades crecientes de proteína viral (VP1 o NS6/7) desde las 3 hasta las 9 horas observadas en los ensayos de western blot e inmunofluorescencia, demuestran la progresión de la infección (**Figura 6 y Figura 7**). Una observación interesante es que cuando se realizaron los ensayos de sobreposición entre la proteína viral y p53, se observó un viraje en el color desde las 3 hpi, que aumenta con relación al progreso de la infección, sugiriendo que estas proteínas colocalizan en las células infectadas. Al realizar los ensayos de coeficiente de correlación de Pearson (CCP) se obtuvieron valores de  $0.32 \pm 0.19$ ,  $0.55 \pm 0.19$  and  $0.65 \pm 0.11$  entre p53 y VP1 en el citoplasma de células infectadas a las 3, 5 y 7 horas, respectivamente (**Figura 7**), sugiriendo que estas dos proteínas pudieran estar asociadas.

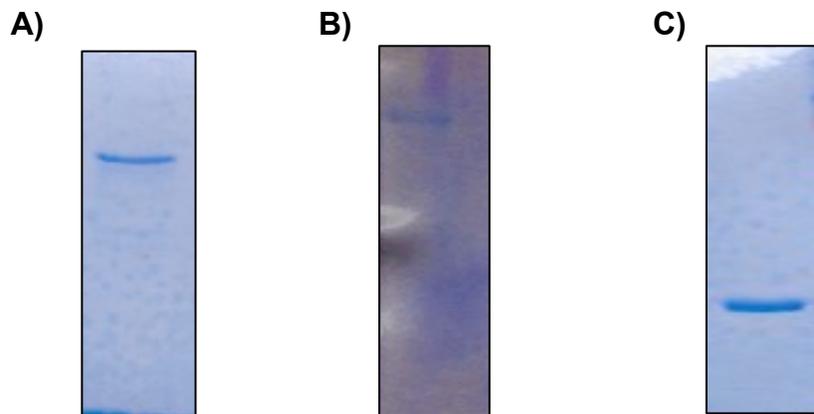


**Figura 7. Localización subcelular de la proteína p53 en células infectadas con FCV.** Células CrFK mock e infectadas con FCV a una MOI de 5 a las 3, 5 y 7 horas fueron marcadas con anticuerpos anti-p53 (rojo) y anti-VP1 de FCV (verde), seguidas de los anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón acoplados a Alexa Fluor 594 o Alexa Fluor 488 respectivamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las células fueron observadas en un microscopio confocal Zeiss LSM 700. Las imágenes representativas de 3 experimentos

independientes corresponden a 15 cortes Z. En el panel MERGE se muestra la colocación representada por el viraje a color amarillo de p53 con VP1 en células infectadas. Los coeficientes de correlación de Pearson fueron  $0.32 \pm 0.19$ ,  $0.55 \pm 0.19$  and  $0.65 \pm 0.11$  a las 3, 5 y 7 horas respectivamente y fueron calculados con el software (<http://icy.bioimageanalysis.org>).

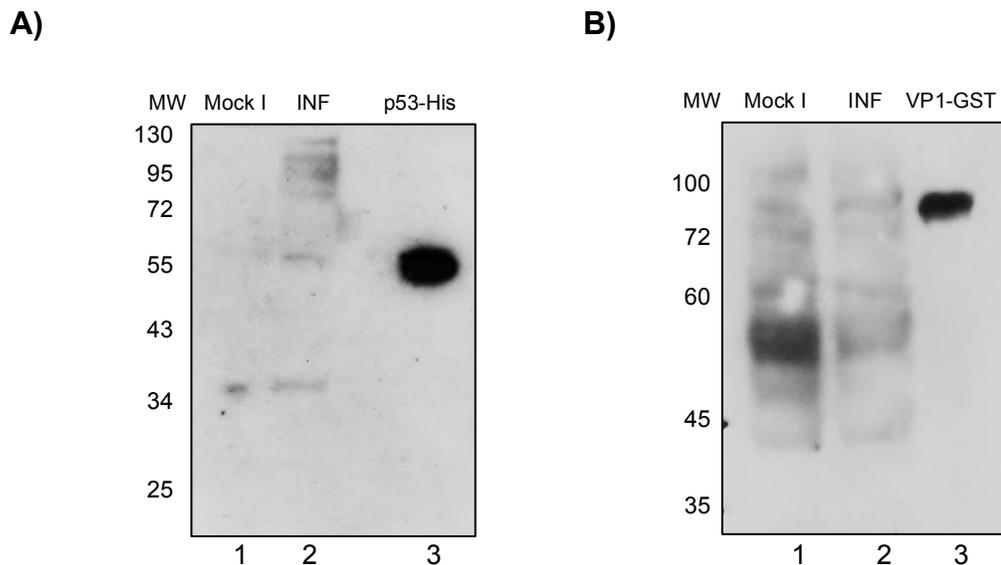
### **p53 interacciona con VP1 de FCV en células infectadas**

La colocación observada entre las proteínas de p53 con VP1 sugiere que ambas proteínas interactúan, por lo que decidimos confirmar si esta interacción ocurre. Inicialmente para validar esta hipótesis, realizamos un ensayo de *far western blot* usando las proteínas recombinantes purificadas VP1-GST de FCV y p53-His (**Figura 8**).



**Figura 8. Proteínas recombinantes expresadas en sistemas de expresión procariota. A)** p53-His clonada en el vector de expresión procariota pET15b. **B)** VP1-GST clonada en el vector de expresión procariota pGEX-5X. **C)** GST inducida del vector de expresión procariota pGEX-5X.

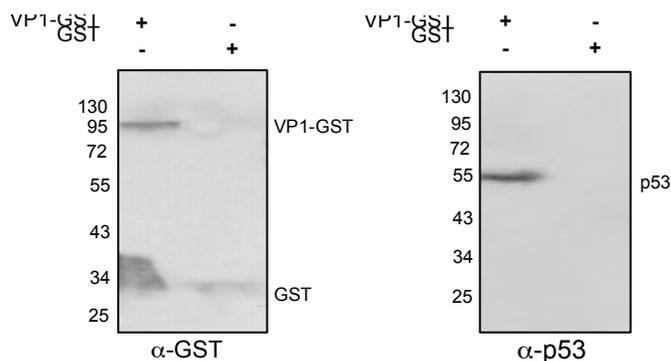
Mediante ensayos de *far western blot*, extractos totales de células mock e infectadas con FCV a una MOI de 5, fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa, bloqueados con leche al 5% e incubados con la proteína VP1-GST o p53-His. El resultado al incubar la proteína p53-His fue la detección de bandas entre 130 y 34 KDa, entre las cuales dos de 60 y 75 KDa corresponden al peso molecular del precursor LC-VP1 y de la proteína madura VP1 respectivamente (**Figura 9A**). El ensayo realizado con VP1-GST, mostró bandas de 100 a 42 KDa en las condiciones mock e infectadas, entre estas bandas las de 53 y 42 KDa corresponden a los pesos moleculares de p53 y al receptor funcional de FCV, la molécula fJAM-1 (**Figura 9B**) (Makino et al., 2006).



**Figura 9. A) La proteína recombinante p53-His reconoce proteínas del peso molecular de VP1 en extractos de células infectadas.** Extractos de proteínas de células mock e infectadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con la proteína recombinante p53-His, seguido del anticuerpo anti-His. Proteínas de 130, 100, 95, 75, 55 y 34 kDa se detectaron en células infectadas. **B) VP1-GST reconocen una serie de bandas en células mock e infectadas correspondientes en peso a p53 y JAM-1.** Extractos de proteínas de células mock e infectadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron

con la proteína recombinante VP1-GST, seguido del anticuerpo anti-GST. Proteínas de 110, 95, 75, 60, 53, 50, y 39 kDa se detectaron en células mock e infectadas. Los controles positivos se muestran en los carriles 3 en cada condición.

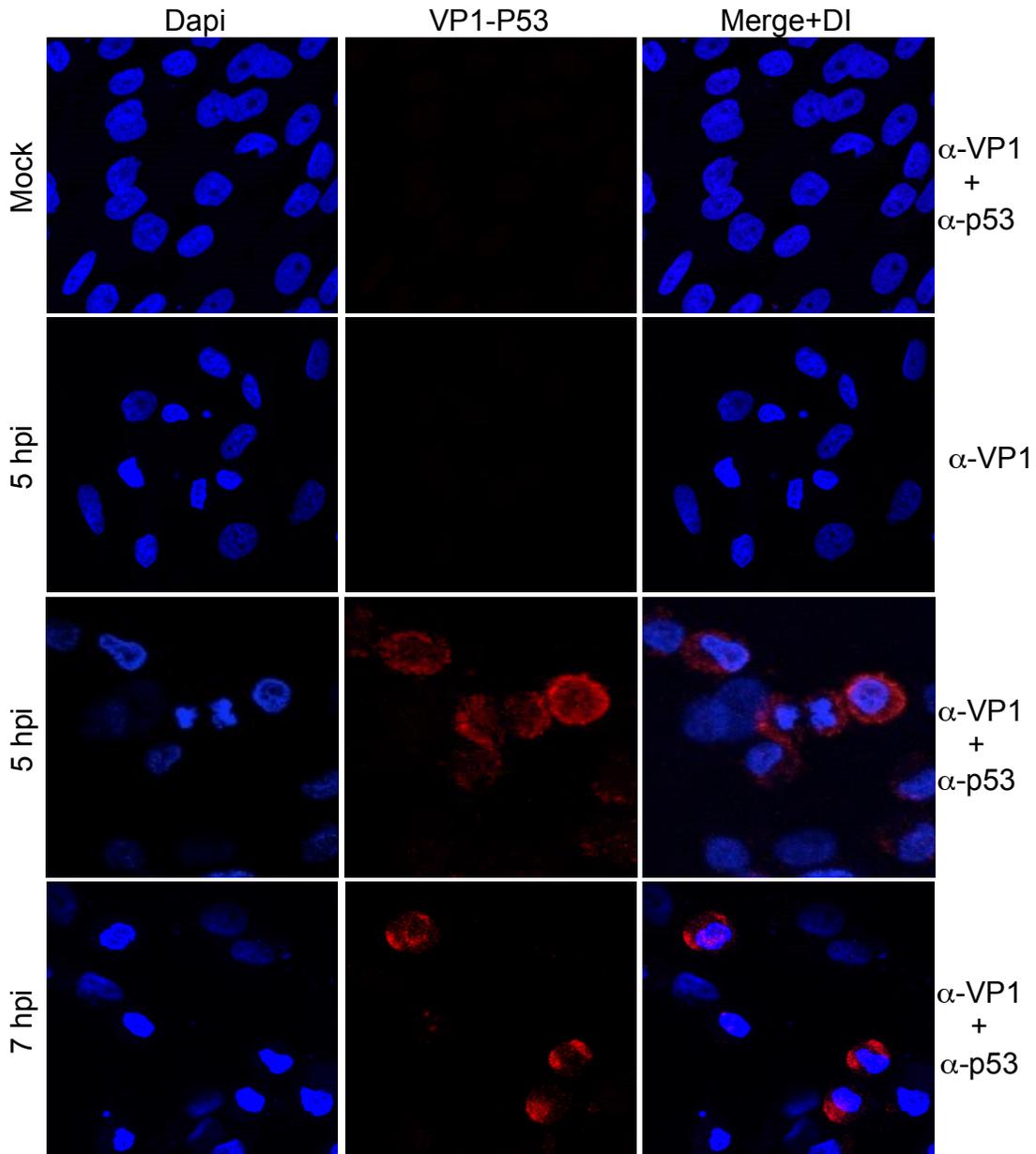
Los resultados obtenidos por *far western blot* sugieren: por un lado que p53-His interacciona con la proteína VP1 de FCV en extractos de células infectadas; y por otro que VP1-GST interacciona con p53 en extractos de células mock e infectadas. Sin embargo, para validar esta interacción se realizaron ensayos de *pull down*. Extractos totales de células CrFK fueron incubados con la proteína VP1-GST o GST, posteriormente se precipitaron con perlas de glutatión acoplado a agarosa y luego de tres lavados, fueron eluidos por intercambio iónico con glutatión reducido al 20 mM. Finalmente el producto de elución fue analizado por *western blot*. La proteína VP1-GST precipitó a la proteína p53 presente en los lisados celulares, sugiriendo que ambas proteínas interaccionan. La proteína GST, usada como control negativo no precipitó p53, lo que valida la especificidad de la interacción (**Figura 10**).



**Figura 10. La proteína VP1-GST precipita a la proteína p53 presente en los extractos de proteínas celulares.** Extractos de proteína total de células CrFK fueron incubados con la proteína VP1-GST de FCV o GST a concentraciones equimolares. Posteriormente se precipitaron con perlas de glutatión acopladas a agarosa y luego de tres lavados, se eluyeron con glutatión reducido. En el panel de la izquierda se observan

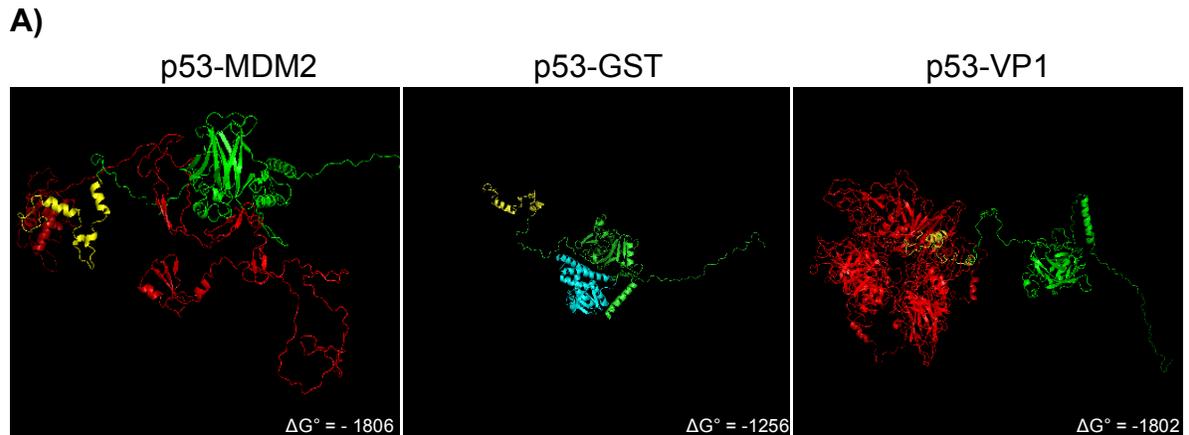
las proteínas VP1-GST y GST en su tamaño esperado. La proteína VP1-GST precipitó a la proteína celular p53 (derecha). La proteína GST no precipitó a la proteína celular p53.

Para confirmar la interacción de p53 y VP1, se realizó un ensayo de ligación por proximidad [proximity ligation assay (PLA)] en células CrFK mock e infectadas con FCV. Dicho ensayo permite determinar la interacción *in situ* proteína-proteína en condiciones en las que se conserva la arquitectura celular. En las células infectadas por 5 y 7 h en las que se realizó el ensayo con los anticuerpos para la detección de las proteínas p53 y VP1 se observó una señal positiva (marca roja) en la región citoplasmática, confirmando que ambas proteínas interactúan en células infectadas (**Figura 11, paneles inferiores**). Sin embargo, cuando este ensayo se realizó con las células mock no se observó ninguna señal, como era de esperarse (**Figura 11 panel superior**). Tampoco observamos señal en células infectadas incubadas con solo el anticuerpo anti-VP1, validando la especificidad de la señal (**Figura 11**).

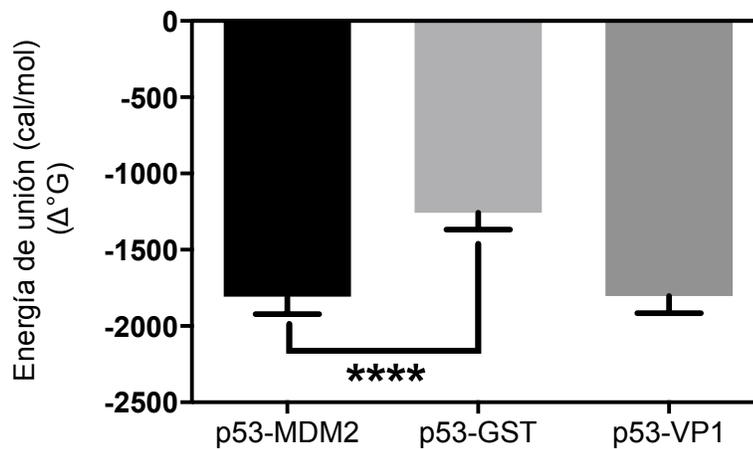


**Figura 11. Las proteínas p53 y VP1 interactúan en células infectadas con el FCV.** Ensayo de ligación por proximidad (PLA-Duolink) entre VP1 y p53 en células mock o infectadas con FCV a las 5 o 7 hpi e incubadas con ambos anticuerpos primarios dirigidos contra p53 y VP1-FCV. La señal de PLA en rojo representa la asociación de p53 con VP1. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Para profundizar en el estudio de la interacción directa de p53 con la proteína mayoritaria de la cápside VP1, se realizaron ensayos de docking molecular *in silico* como primera aproximación, evaluando los valores de las energías libres. El modelo de la estructura 3D de p53 de *Felis catus* se obtuvo con el software RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu>)(10.1093/bioinformatics/btt211) y las interacciones moleculares proteína-proteína de p53 con VP1, MDM2 y GST se realizaron en el sitio ClusPro protein-protein docking (cluspro.org). Las energías de unión similares  $\Delta G^\circ$  (cal/mol) se obtuvieron para las interacciones VP1-p53 ( $\Delta G^\circ = -1802$ ) y p53- MDM2 ( $\Delta G^\circ = -1806$ ), siendo esta última la interacción usada como control positivo (**Figura 12A**) (Momand et al., 1992) (Chen, Marechal, & Levine, 1993). La energía de unión de la predicción de la interacción de p53-GST ( $\Delta G^\circ = -1256$ ) usada como control negativo muestra diferencia significativa comparada con el control positivo. Los resultados de los ensayos de docking molecular apoyan los resultados experimentales y sugieren que p53 interactúa directamente con VP1 de FCV (**Figura 12B**).

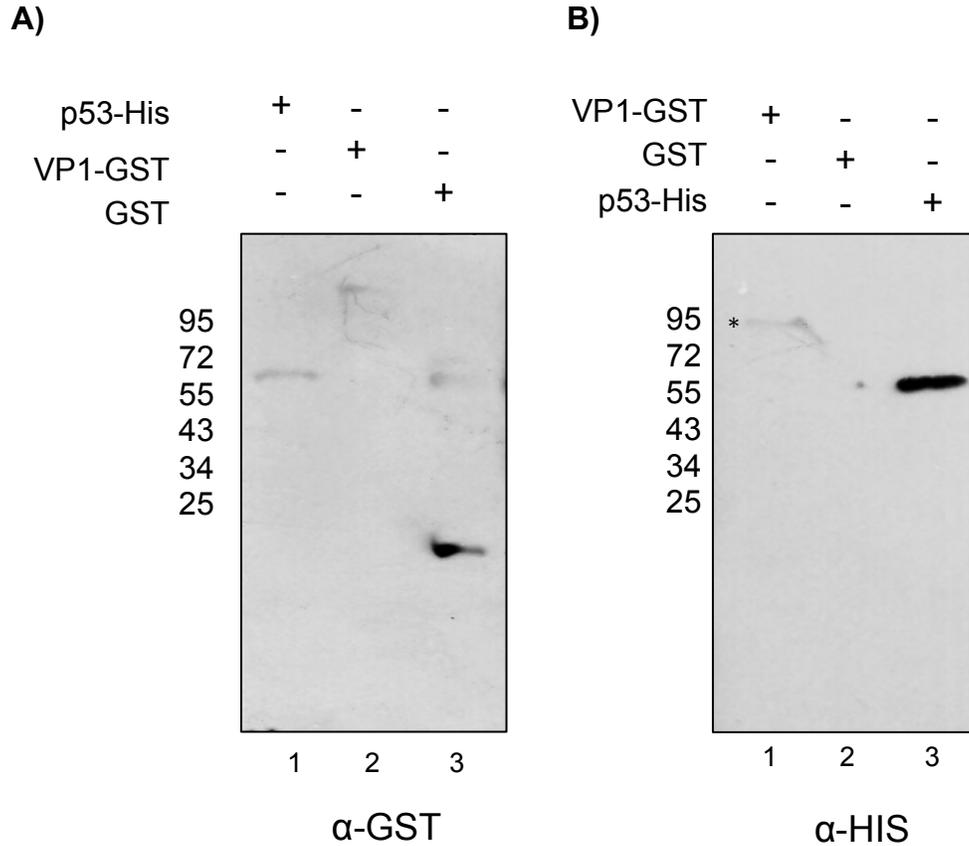


**B)**



**Figura 12. Predicción de la interacción directa de p53 con VP1 por docking molecular** **A)** Modelos en 3D de los ensayos de Docking molecular de p53 de *Felis catus* (verde) con MDM2, GST y VP1 de FCV. La región N terminal de p53 se muestra en amarillo. **B)** Análisis estadístico de las energías libres ( $\Delta G^\circ$ ) de las interacciones proteína-proteína obtenidas por hidrofobicidad del servidor ClusPro server (<https://cluspro.bu.edu/home.php>). Los valores estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 8.00. \*\*\*\* $p \leq 0.0001$  calculado por one-way ANOVA. Las barras representan la desviación estándar de las energías de al menos 3 predicciones en cada condición.

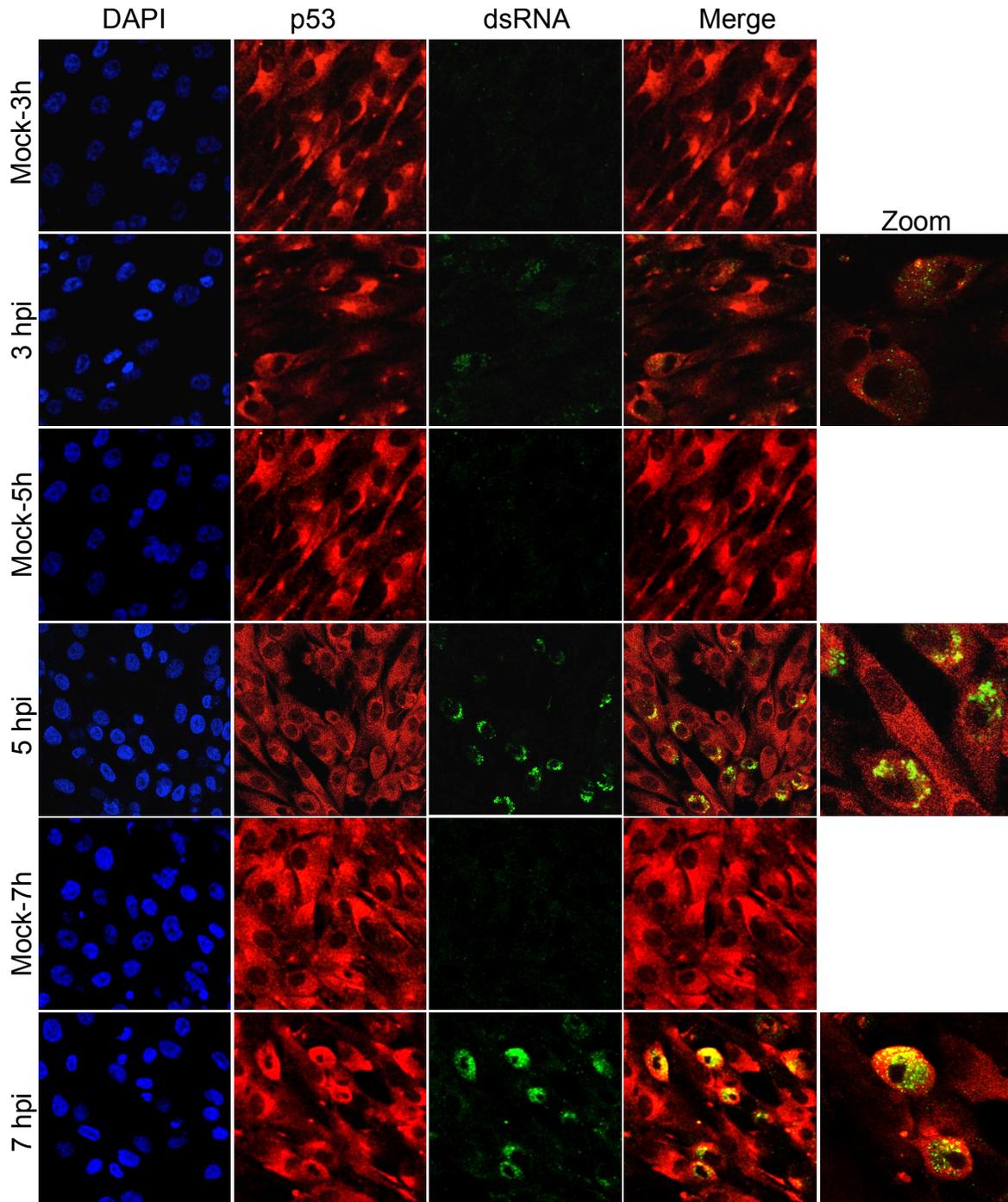
Para determinar si la interacción de p53 con VP1 de FCV pudiera darse de forma directa, se realizaron ensayos de *overlay* con las proteínas recombinantes p53-His y VP1-GST. Para ello, 5 µg de proteína recombinante p53-His, VP1-GST o GST (control) fueron sometidas a SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente se incubaron con la proteína recombinante de interés para determinar su posible interacción. En el caso de la proteína p53-His fija en la membrana, al incubarse con VP1-GST y revelar contra la etiqueta GST, se observó una banda correspondiente en peso a la proteína recombinante p53 (**Figura 13 panel izquierdo**). Por otro lado, en el caso de la proteína VP1-GST en la membrana y al incubarse con p53-His en solución, al revelar la etiqueta de histidinas se observó una banda a la altura del peso correspondiente a la VP1-GST (**Figura 13 panel derecho**). Estos datos sugieren que ambas proteínas pudieran asociarse de forma directa en células infectadas.



**Figura 13. Las proteínas p53-His y VP1-GST interactúan directamente *in silico* en ensayos de overlay.** Proteína recombinante VP1-GST, GST y p53-His se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con la proteína recombinante VP1-GST o p53-His seguido del anticuerpo dirigido contra cada etiqueta correspondiente a cada recombinante. **A)** Una banda de 55 KDa en el carril 1 de se detectó, correspondiente a la proteína p53-His. **B)** Una banda de 95 KDa en el carril 1 de se detectó, correspondiente a la proteína VP1-GST.

## **p53 se asocia al RNA de doble cadena en células infectadas**

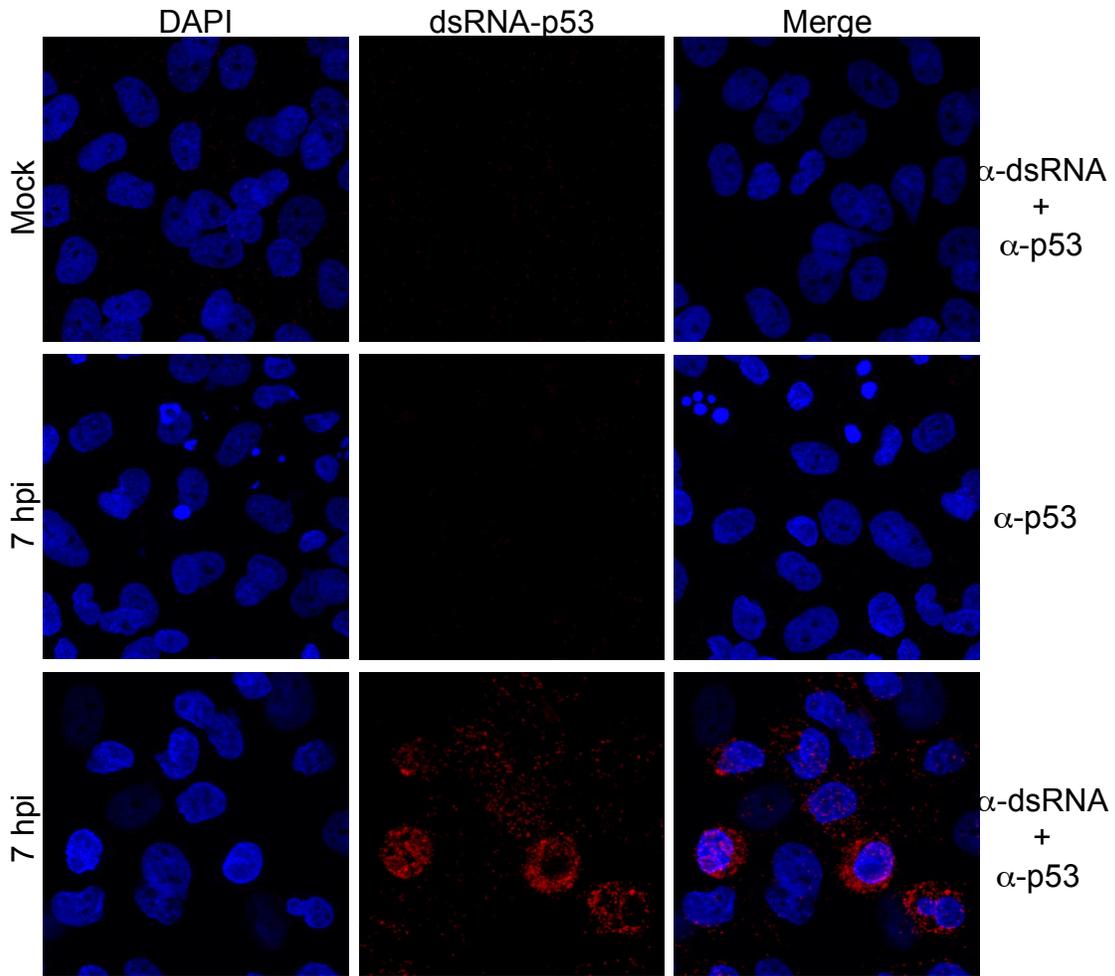
Los complejos replicativos son estructuras membranosas donde ocurre la replicación del RNA genómico y RNA subgenómico y se sabe que el RNA de doble cadena (RNAdc) y la proteína VP1 de FCV son los elementos virales más abundantes en estas estructuras (Green et al., 2002). Debido a que observamos que la colocación de p53 con VP1 es perinuclear en la región citoplasmática, especulamos si p53 podría localizarse en los complejos replicativos. Por los elementos anteriores, resultaba interesante determinar si la proteína p53 podría colocarse con el RNAdc viral. Mediante ensayos de inmunofluorescencia observamos que la marca correspondiente a la proteína p53 se localiza principalmente en la región citoplasmática tanto en las células mock como en las infectadas (**Figura 14**), mientras que la marca del RNAdc se observó principalmente en la región perinuclear únicamente en las células infectadas, como era de esperarse. Debido a que también se observó un viraje de color en las células infectadas y marcadas con los anticuerpos anti-p53 y anti-RNAdc, determinamos la correlación mediante el coeficiente de Pearson, el cual resultó ser de  $0.2 \pm 0.03$ ,  $0.50 \pm 0.09$  y  $0.59 \pm 0.11$  a las 3, 5 y 7 hpi respectivamente, indicando un aumento progresivo de la infección, corroborando la presencia de p53 en los complejos replicativos virales, y sugiriendo una posible asociación de p53 con el RNAdc (**Figura 14**).



**Figura 14. El RNA<sub>dc</sub> de FCV colocaliza con p53 en los complejos replicativos.** Células CrFK mock e infectadas con FCV a una MOI de 5 a las 3, 5 y 7 horas fueron marcadas con anticuerpos anti-p53 (rojo) y anti-RNA<sub>dc</sub> de FCV (verde), seguidas de los anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón acoplados a Alexa Fluor 594 o Alexa Fluor 488 respectivamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las células fueron

observadas en un microscopio confocal Zeiss LSM 700. Las imágenes representativas de 3 experimentos independientes corresponden a 15 cortes Z. En el panel MERGE se muestra la colocalización representada por el viraje a color amarillo de p53 con VP1 en células infectadas. Los coeficientes de correlación de Pearson fueron  $0.20 \pm 0.03$ ,  $0.50 \pm 0.09$  and  $0.59 \pm 0.11$  a las 3, 5 y 7 horas respectivamente y fueron calculados con el software (<http://icy.bioimageanalysis.org>).

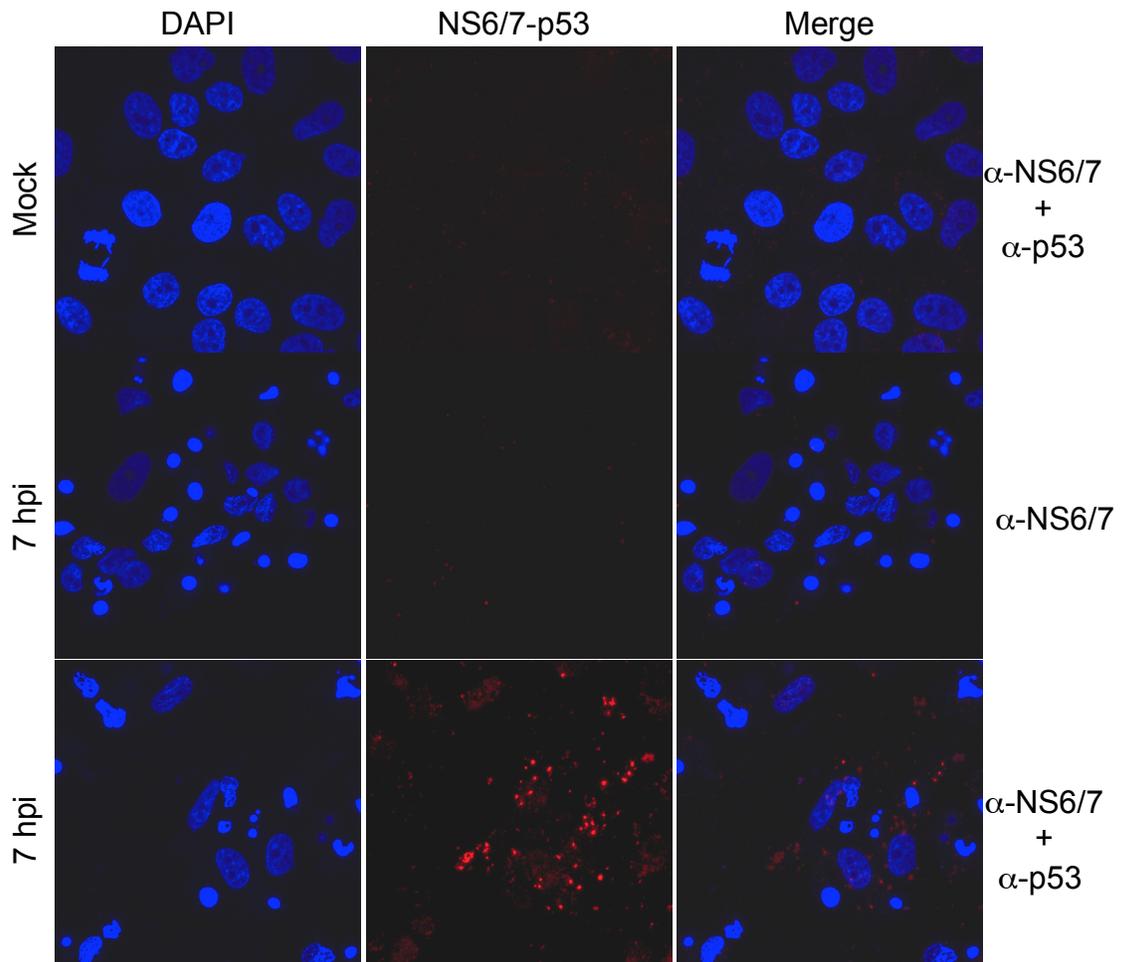
Para confirmar la asociación de p53 y el RNAdc, se realizaron ensayos de PLA en células CrFK infectadas con FCV. La señal positiva en rojo en la región citoplasmática de células infectadas con FCV a las 7 hpi incubadas con ambos anticuerpos primarios (anti-p53 y anti-RNAdc) confirmó la interacción de p53 con el RNAdc (**Figura 15**). No se observó señal en las células no infectadas e incubadas con ambos anticuerpos primarios ni en células infectadas e incubadas solo con el anticuerpo anti-p53, demostrando la especificidad de la señal.



**Figura 15. p53 se asocia al RNAdc en células infectadas por FCV.** Ensayo de ligación por proximidad (PLA-Duolink) entre p53 y RNAdc en células infectadas con FCV a las 7 hpi. La señal de PLA en rojo representa la asociación de p53 con RNAdc. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

## **p53 se asocia a la proteasa-polimerasa del FCV**

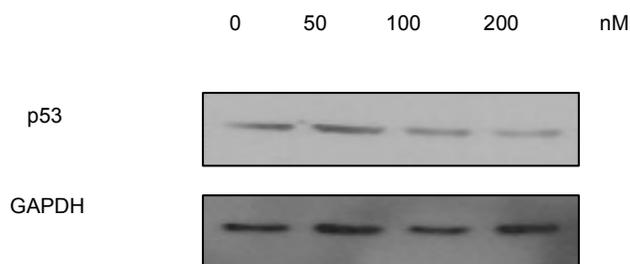
Dado que sabemos que la proteína VP1 puede asociarse a la proteína NS6/7 y favorecer la replicación del RNAg viral (Chennareddy V. Subba-Reddy, Yunus, Goodfellow, & Kao, 2012), y a que por otro lado p53 se une a VP1, quisimos determinar si la proteína p53 podría ser parte de este complejo y con ello corroborar su presencia en los complejos de replicación. Mediante ensayos de PLA, determinamos que p53 se asocia de manera discreta con la proteína NS6/7 en células infectadas con FCV (**Figura 16**). La señal positiva en rojo en la región citoplasmática de células infectadas con FCV a las 7 hpi incubadas con ambos anticuerpos primarios (anti-p53 y anti-NS6/7) confirmó la asociación de p53 con el la proteasa-polimerasa viral. No se observó señal en las condiciones de controles negativos de células no infectadas e incubadas con ambos anticuerpos primarios ni en células infectadas e incubadas solo con el anticuerpo anti-NS6/7, demostrando la especificidad de la señal.



**Figura 16. p53 se asocia con la proteasa-polimerasa NS6/7 de FCV en células infectadas.** Ensayo de ligación por proximidad (PLA-Duolink) entre p53 y NS6/7 en células infectadas con FCV a las 7 hpi. La señal de PLA en rojo representa la asociación de p53 con NS6/7. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

## El silenciamiento de p53 resulta en el retraso del efecto citopático y reducción de proteína y progenie viral

Para determinar si la proteína p53 tenía un papel en la replicación del FCV, se decidió realizar ensayos de infección en células que tuvieran baja expresión de p53, para lo cual utilizamos la técnica de siRNA. Inicialmente se determinaron las concentraciones de si-RNA p53 que tuvieran el mejor efecto en silenciar la expresión de dicha proteína. Para ello células CrFK fueron transfectadas con concentraciones de 50, 100 y 200 nM de siRNA-p53, siendo la concentración de 200 nM la que muestra una mayor eficiencia de silenciamiento (**Figura 17**).

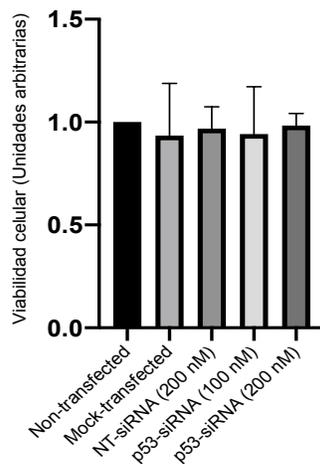


**Figura 17. Silenciamiento de p53 en células transfectadas con concentraciones crecientes de siRNAs específicos.** Western blot de la estandarización del silenciamiento con siRNAs de interferencia dirigidos contra p53 a concentraciones crecientes de 0, 50, 100 y 200 nM.

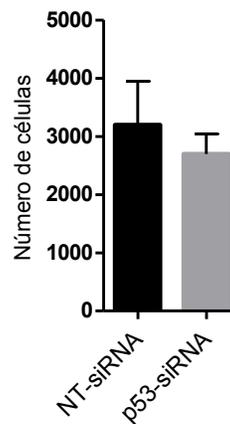
Para descartar un efecto negativo en la viabilidad por la transfección con los interferentes, se realizó un ensayo de viabilidad celular en células expuestas a la mayor concentración de siRNA silenciador (200 nM). No se observaron cambios en la viabilidad de la monocapa en ninguna de las condiciones experimentales y/o

controles probadas con el siRNA-no relacionado o siRNA-p53 (**Figura 18A**). De igual modo, se evaluó el efecto de la transfección de ambos interferentes en la proliferación celular y no se encontró diferencia estadísticamente significativa (**Figura 18B**).

**A)**



**B)**



**Figura 18. La interferencia de p53 no afecta la viabilidad ni la proliferación celular.** **A)** Células CrFK fueron transfectadas con 100 nM de siRNA-NR, 100 o 200 nM de siRNA-p53 por 24 horas. La viabilidad celular fue medida usando el Cell Titer 96 AQueous nonradioactive cell proliferation assay y normalizado en relación a las células no transfectadas. **B)** La proliferación celular se midió contando el número de células con fenotipo fibroblastoide después de 24 hrs de haberse transfectado con los interferentes mencionados, utilizando un microscopio Nikon Eclipse Ti-U. El número de células se obtuvo con el software NIS-Elements AR análisis y se comparó el número de células en tres campos distintos en ambas condiciones de transfección.

Una vez estandarizadas las condiciones de silenciamiento y habiendo descartado un efecto en la viabilidad celular, las células CrFK se transfectaron con 200 nM RNAs de los interferentes siRNA-p53 y siRNA-no relacionado por 24 horas y posteriormente infectadas a una MOI de 5 por 5 o 7 horas. En estos ensayos se

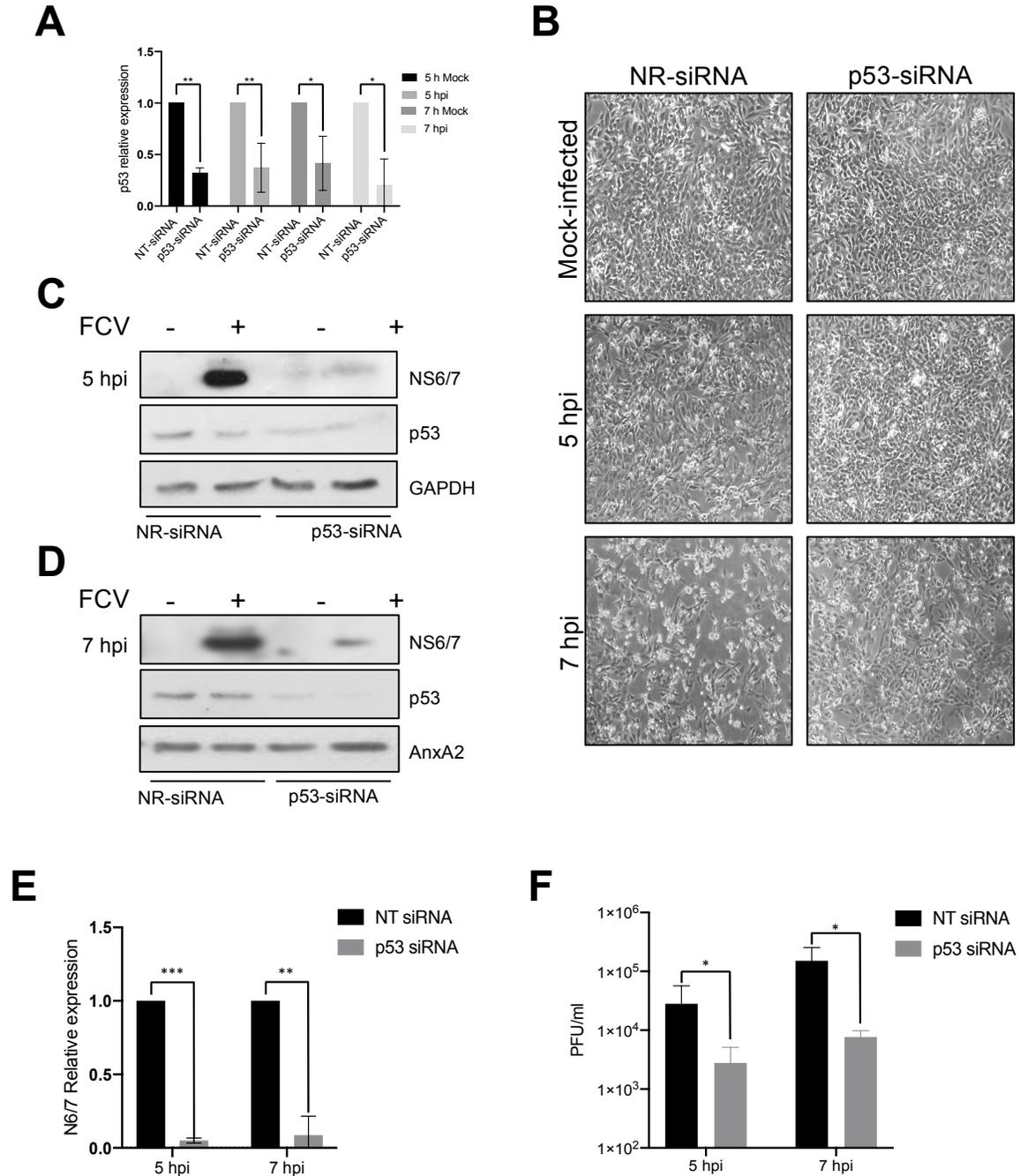
logró la reducción del 60% de la expresión de p53 en células transfectadas con interferentes específicos contra p53 tanto infectadas como no infectadas, en comparación a las células transfectadas con los interferentes no relacionados **(Figura 19A)**.

El efecto del silenciamiento de p53 en células infectadas con FCV se determinó de tres maneras diferentes: midiendo la extensión del daño citopático mediante microscopía óptica; midiendo los niveles de expresión de proteína viral NS6/7 mediante western blot y midiendo la progenie viral mediante ensayos de plaqueo.

Cuando se analizó el efecto citopático en las células transfectadas con siRNAs-p53 comparadas e infectadas por 5 h, se observó una menor destrucción de la monocapa en relación a las células tratadas con siRNA-NR; esta diferencia se observó aún mas clara en las condiciones en las que las células se infectaron por 7 h **(Figura 19B)**, lo que sugiere una menor eficiencia en la replicación viral en células donde la expresión de p53 es menor. Al analizar la expresión de proteína viral NS6/7 en las células transfectadas con el siRNA-p53 e infectadas con FCV a las 5 y 7 h, mediante western blot, observamos una reducción del 95 y 91% respectivamente de la expresión de NS6/7 en relación a la observada en las células infectadas con el siRNA-NR. Esta observación correlaciona con el retraso en el efecto citopático mencionado anteriormente **(Figura 19E)**.

Finalmente, al cuantificar la progenie viral por ensayos de plaqueo de los sobrenadantes obtenidos a las 5 o 7 hpi en células transfectadas con siRNAs-p53 detectamos una reducción de un 90.2 y 95% de partículas virales a las 5 y 7 hrs

respectivamente, lo que indica que p53 es requerida para una replicación eficiente de FCV (**Figura 19F**).



**Figura 19. La proteína celular p53 participa en una replicación eficiente de FCV. Células CrFK** transfectadas con siRNA-NR o siRNA-p53 por 24 h fueron infectadas o no con FCV a una MOI de 5 por una hora. A) Niveles de expresión de p53 en células mock e infectadas y transfectadas con siRNA-NR o siRNA-

p53. B) Efecto citopático monitoreado y observado por microscopía óptica a las 5 o 7 hpi mostró un retraso en su aparición en células infectadas previamente transfectadas con siRNA-p53 comparado con las transfectadas con siRNA-NR. Western blot de extractos totales de proteína de células transfectadas e infectadas con FCV a las 5 o 7 hpi C) y D) respectivamente. NS6/7 indica la proteína viral como control de infección, GAPDH o AnxA2 se usaron como control de carga. E) Cuantificación de la intensidad de la proteína viral NS6/7 usando ImageJ software. La desviación estándar se obtuvo de 3 experimentos independientes y los datos se evaluaron por two-way ANOVA test usando GraphPad Prism 8.00 software.  $**p \leq 0.05$  and  $***p \leq 0.0001$ . F) Progenie viral obtenida a las 5 y 7 hpi de los sobrenadantes de las células infectadas y previamente transfectadas. Los datos fueron analizados usando t-test usando GraphPad Prism 8.00 software.  $*p \leq 0.05$ . Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes.

## Discusión

La proteína celular p53 es un supresor tumoral que puede ser acumulado y activado por una gran variedad de señales de estrés. Una vez activada, p53 regula etapas celulares que definen el destino celular: arresto del ciclo celular, diferenciación celular, senescencia celular y apoptosis [Revisado en: (Aloni-Grinstein et al., 2018)]. La principal función de p53 es conservar la homeostasis celular por la activación directa o indirecta de una gran cantidad de genes [Revisado en: (Grossi, Sánchez, & Huarte, 2016)]. Sin embargo, p53 participa también en otras vías como: autofagia, metabolismo celular, plasticidad celular y pluripotencialidad y facilita una forma de muerte celular dependiente de hierro conocida como ferroptosis (Kastenhuber & Lowe, 2017).

El estado estacionario de p53 es regulado por la proteína MDM2 mediante su actividad de ubiquitin-ligasa. MDM2 ubiquitina a p53 para su degradación por la vía proteosomal. Dicha degradación en condiciones en las que no hay estrés

celular ocasiona que los niveles de p53 sean tan bajos para que esta proteína sea detectada (Levine & Oren, 2009). Al haber daño al DNA por alguna señal de estrés, p53 se fosforila y evade la degradación proteosomal, posteriormente se estabiliza y se activa como factor de transcripción que induce al arresto del ciclo celular o apoptosis mediante la expresión de genes relacionados a estas vías, un claro ejemplo es la proteína inhibidora de cinasa dependiente de ciclina p21 (Karimian et al., 2016). Por lo tanto, las vías relacionadas a la dinámica del estado estacionario de p53 se modulan por los niveles de expresión y por sus modificaciones postraduccionales [Revisado en (Sato & Tsurumi, 2013)].

En relación a infecciones virales, el estado estacionario de p53 puede modularse como resultado del estrés celular ocasionado y de esta manera tener una replicación viral más eficiente. Algunos virus pueden activar p53, algunos inducen su inhibición y/o degradación, y otros modulan su activación y/o degradación de forma diferencial en determinadas etapas del ciclo replicativo viral [Revisado en :(Aloni-Grinstein et al., 2018)].

Hasta hoy, sabemos que miembros de la familia *Caliciviridae* inducen apoptosis (Al-Molawi et al., 2003) (Sosnovtsev et al., 2003) (Roberts et al., 2008) (Natoni et al., 2006), una vía en la cual p53 tiene un papel relevante a nivel de expresión genética y a nivel bioquímico. Sin embargo, la participación de p53 en la replicación de los calicivirus no ha sido estudiada, por lo cual el objetivo de este trabajo fue determinar si p53 participa en la replicación de FCV, uno de los mejores modelos para estudiar la replicación de virus de esta familia.

Durante la infección por el FCV la localización subcelular de p53 se observó principalmente en la región citoplasmática tanto en las células mock como en las

infectadas; por otro lado, aunque los niveles de expresión de p53 no muestran un cambio estadísticamente significativo, se observa una tendencia a su reducción a partir de las 7 hpi. Adicionalmente, ensayos preliminares muestran una tendencia en la caída de la expresión de p21, sugiriendo una posible disminución en la actividad transcripcional basal de p53 en las células infectadas por FCV.

Un hallazgo interesante es el que a partir de las 3 hpi se observó colocalización entre p53 y la proteína VP1 de FCV que incrementó a las 5 y 7 hpi, sugiriendo que ambas proteínas interactúan durante la infección. En este sentido, durante la infección con el virus de la influenza A (IAV), p53 es activada en dos maneras: a tiempos tempranos después de la infección y posteriormente a la mitad del ciclo de replicación viral, que corresponde al inicio de la apoptosis inducida por IAV (Shen et al., 2009) (Turpin et al., 2005) (Xue Wang et al., 2014). Mientras la proteína no estructural 1 (NS1) que corresponde a un factor de virulencia no esencial, interactúa con p53 inhibiendo su actividad de factor de transcripción y apoptótica, la nucleoproteína viral (NP) con actividad de factor de transcripción viral, replicación y ensamble (Portela & Digard, 2002), interactúa con p53 incrementando su actividad transcripcional (Xiaodu Wang et al., 2012) y modulando la respuesta inmune (B. Wang et al., 2018). Por lo anterior, se decidió evaluar si p53 interactuaba con la proteína de VP1 de FCV. Resultados obtenidos por varias técnicas experimentales, indican que p53 y VP1 interactúan en células infectadas con FCV. La asociación de p53 con VP1 fue mostrada por los ensayos de *far western blot* y validada en un sistema *pull down in vitro*. Posteriormente la posible asociación directa entre ambas proteínas fue analizada y sugerida con ensayos de overlay y posteriormente fue confirmada por ensayos

de ligación por proximidad en células infectadas con FCV. Finalmente, análisis *in silico* sugieren que la interacción entre VP1 y p53 está favorecida energéticamente.

Interesantemente, la regulación de p53 también puede ser por el resultado de la interacción de proteínas virales estructurales de la cápside con MDM2, su principal proteína reguladora. El extremo carboxilo terminal de la proteína de la cápside del virus zika (ZIKV) interacciona con MDM2, activando la muerte de células neuronales infectadas (Teng et al., 2017); mientras la proteína de la cápside de WNV interacciona con HDM2 (hómologo humano de MDM2) que es secuestrado en el nucléolo y resulta en la estabilización de p53 y la inducción de apoptosis (Yang et al., 2008). Resulta interesante estudiar si existe alguna interacción del homólogo de MDM2 en células CrFK con alguna proteína de FCV, o si esta sufre modificaciones durante la infección.

Considerando que VP1 es la proteína más abundante en los complejos replicativos (Green et al., 2002), había probabilidad que p53 fuera reclutada en estas estructuras membranosas. La colocalización de p53 con el RNAdc en la región perinuclear observada por ensayos de inmunofluorescencia y la asociación de ambas moléculas por ensayos de ligación por proximidad demuestran que p53 está presente en los complejos replicativos, por lo cual la asociación de p53 con VP1 podría localizarse en estos compartimentos celulares. En este sentido, hay reportes que demuestran que p53 se asocia al genoma de algunos virus, particularmente con aquellos que poseen genomas de doble cadena. En el caso del virus del papiloma humano 77 (VPH77), en la región genómica no codificante activa un promotor en respuesta a radiación UV (Purdie et al., 1999).

Recientemente se han reportado dos nuevos elementos de respuesta a p53 (p53RE) en el genoma del virus herpes simples-1 (HSV-1), que regulan la expresión de proteínas virales (Hsieh, Kuta, Armour, & Boehmer, 2014). En el caso de virus que llevan a cabo transcripción inversa, como el virus de la hepatitis B (HBV), la interacción de p53 con elementos potenciadores en el genoma viral modula su actividad de factor de transcripción (Ori et al., 1998); y en el genoma de HIV-1 se han reportado sitios de unión a p53, que de igual manera modulan su actividad transcripcional (Gualberto et al., 1995).

Adicionalmente a la asociación de p53 con VP1 y con el RNAdc de FCV, por ensayos de ligación por proximidad se demostró la asociación de p53 con la proteasa-polimerasa NS6/7de FCV. Dicha asociación sugiere la participación de p53 en la replicación genómica y/o traducción de proteínas virales.

Considerando que p53 está asociada al menos a tres elementos virales: la proteína estructural VP1, NS6/7 y el RNAdc, resulta lógico esperar que esta proteína tuviera una participación en la replicación de FCV. El papel de p53 en la replicación de FCV se demostró mediante el silenciamiento de p53 con siRNAs específicos. El silenciamiento de aproximadamente el 60% de la proteína y la posterior infección con FCV mostró un retraso en la aparición del efecto citopático al comparar con las células transfectadas con siRNAs-no relacionado e infectadas. El retraso en el efecto citopático mencionado correlaciona con una menor expresión de la proteína viral NS6/7 a las 5 y 7 hpi y un orden de magnitud menos (1 log) aproximadamente de reducción de la progenie viral. Estos datos demuestran que p53 participa en la replicación de FCV, una participación que es reportada por primera vez en algún miembro de la familia *Caliciviridae*.

Considerando que p53 está localizada en los complejos replicativos, donde ocurre la replicación del RNAg y RNSsg, la traducción de las proteínas estructurales VP1 y VP2, que p53 se asocia a VP1, NS6/7 y al RNAdc, posiblemente p53 participa en estos procesos del ciclo replicativo de FCV. Por un lado se ha reportado la asociación de p53 con RNA de forma activa (Samad & Carroll, 1991). p53 en el citoplasma ejerce actividad de exoribonucleasa en sentido 3'-5' en DNA de cadena sencilla, DNA de cadena doble, RNA de cadena sencilla, RNA de cadena doble y en complejos RNA/DNA (Derech-haim, Friedman, Hizi, & Bakhanashvili, 2020) (Grinberg, Teiblum, Rahav, & Bakhanashvili, 2010). Algunos virus de RNA como los coronavirus, torovirus y rinovirus codifican exoribonucleasas con actividad 3'-5' involucradas en la síntesis de RNAs a partir de sus moldes y ejercen actividad de edición de genomas, para una replicación de alta fidelidad (Minskaia et al., 2006). Además, en la infección por el virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) con un genoma de RNA corto, p53 citoplasmática incrementa la precisión de síntesis de DNA por la transcriptasa reversa (Bakhanashvili, Novitsky, Lilling, & Rahav, 2004). De esta manera, es posible que p53 tenga una participación para una replicación eficiente del RNA de FCV. Por otro lado, la baja expresión de proteína viral no estructural NS6/7 al silenciar p53 puede ser el resultado de una traducción ineficiente o a consecuencia de una menor cantidad de RNAg viral. En este sentido, debido a que VP1 esta presente también en los complejos replicativos y también se asocia a p53, es posible que esta interacción module la actividad de la RNA polimerasa dependiente de RNA de FCV durante su replicación, como en la replicación en norovirus (C. V. Subba-Reddy, Goodfellow, & Kao, 2011). Interesantemente, p53

puede dirigir la degradación y disminución de RNAds, o degradación incompleta que resulta en la generación de RNAdc cortos (Grinberg et al., 2010). Resultaría interesante determinar si p53 participa en la generación del RNAg o RNAsg de FCV.

A modo de conclusión, en este trabajo encontramos que la proteína celular p53 interacciona con la proteína mayoritaria de la cápside VP1 en la región citoplasmática y con el RNA de doble cadena de FCV en los complejos replicativos. El silenciamiento de p53 resultó en una menor expresión de proteína viral NS6/7 y en menor progenie viral liberada, indicando que p53 participa en una replicación viral eficiente. Resultaría interesante determinar la etapa del ciclo replicativo de FCV en la que participa p53 y su mecanismo de acción en la replicación viral.

## **Conclusiones**

- Los niveles y localización celular de p53 no cambian por la infección por FCV
- p53 se asocia a la proteína estructural mayoritaria de la cápside VP1, NS6/7 y al RNA de doble cadena de FCV en los complejos replicativos.
- p53 participa en la replicación de FCV

## **Perspectivas**

- Evaluar la participación de p53 en la replicación del RNAg y/o RNAsg de FCV
- Evaluar la participación de p53 en la traducción de proteínas virales
- Determinar el mecanismo de acción de p53 en la replicación de FCV
- Determinar el efecto de la infección por FCV en proteínas implicadas en la actividad de p53 como MDM2 y p21

## Referencias

- Abente, E. J., Sosnovtsev, S. V., Sandoval-Jaime, C., Parra, G. I., Bok, K., & Green, K. Y. (2013). The Feline Calicivirus Leader of the Capsid Protein Is Associated with Cytopathic Effect. *Journal of Virology*, *87*(6), 3003–3017. <https://doi.org/10.1128/jvi.02480-12>
- Abrantes, J., Van Der Loo, W., Le Pendu, J., & Esteves, P. J. (2012). Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): A review. *Veterinary Research*, *43*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-12>
- Al-Molawi, N., Beardmore, V. A., Carter, M. J., Kass, G. E. N., & Roberts, L. O. (2003). Caspase-mediated cleavage of the feline calicivirus capsid protein. *Journal of General Virology*, *84*(5), 1237–1244. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18840-0>
- Alhatlani, B., Vashist, S., & Goodfellow, I. (2015). Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes. *Virus Research*, *206*, 134–143. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2015.02.002>
- Aloni-Grinstein, R., Charni-Natan, M., Solomon, H., Rotter, V., Aloni-Grinstein, R., Charni-Natan, M., ... Rotter, V. (2018). p53 and the Viral Connection: Back into the Future †. *Cancers*, *10*(6), 178. <https://doi.org/10.3390/cancers10060178>
- Amaral, J. D., Xavier, J. M., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. P. (2010). The Role of p53 in Cancer. *Discovery Medicine*, *9*(February), 145–152. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-22275-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-22275-1_1)
- Angelina V. Vaseva; Ute M. Moll. (2010). The mitochondrial p53 pathway Angelina. *Biochim Biophys Acta*, *1787*(5), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.10.005>
- Bailey, D., Kaiser, W. J., Hollinshead, M., Moffat, K., Chaudhry, Y., Wileman, T., ... Goodfellow, I. G. (2010). Feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation. *Journal of General Virology*, *91*(3), 739–749. <https://doi.org/10.1099/vir.0.016279-0>
- Bakhanashvili, M., Novitsky, E., Lilling, G., & Rahav, G. (2004). P53 in cytoplasm may enhance the accuracy of DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Oncogene*, *23*(41), 6890–6899. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207846>
- Barrera-Vázquez, O. S., Cancio-Lonches, C., Hernández-González, O., Chávez-Munguía, B., Villegas-Sepúlveda, N., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2019). The feline calicivirus leader of the capsid protein causes survivin and XIAP downregulation and apoptosis. *Virology*, *527*, 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.11.017>
- Barrera-Vázquez, O. S., Cancio-Lonches, C., Miguel-Rodríguez, C. E., Pérez, M. M. V., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2019). Survivin overexpression has a negative effect on feline calicivirus infection. *Viruses*, *11*(11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/v11110996>
- Bhar, S., & Jones, M. K. (2019). In vitro replication of human norovirus. *Viruses*, *11*(6). <https://doi.org/10.3390/v11060547>
- Bishop, R. F., & Kirkwood, C. D. (2008). Enteric Viruses. *Encyclopedia of Virology*, (July), 116–123. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00386-1>
- Cancio-Lonches, C., Yocupicio-Monroy, M., Sandoval-Jaime, C., Galvan-Mendoza, I.,

- Urena, L., Vashist, S., ... Gutierrez-Escolano, A. L. (2011). Nucleolin Interacts with the Feline Calicivirus 3' Untranslated Region and the Protease-Polymerase NS6 and NS7 Proteins, Playing a Role in Virus Replication. *Journal of Virology*, *85*(16), 8056–8068. <https://doi.org/10.1128/jvi.01878-10>
- Chen, J., Marechal, V., & Levine, A. J. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(7), 4107–4114. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.7.4107>
- Clarke, I. N., & Lambden, P. R. (1997). The molecular biology of caliciviruses. *Journal of General Virology*, *78*(2), 291–301. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-2-291>
- Clarke, I. N., & Lambden, P. R. (2000). Organization and Expression of Calicivirus Genes. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*(s2), S309–S316. <https://doi.org/10.1086/315575>
- Conley, M. J., McElwee, M., Azmi, L., Gabrielsen, M., Byron, O., Goodfellow, I. G., & Bhella, D. (2019). Calicivirus VP2 forms a portal-like assembly following receptor engagement. *Nature*, *565*(7739), 377–381. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0852-1>
- Crandell, R. A., Fabricant, C. G., & Nelson-Rees, W. A. (1973). Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *In Vitro*, *9*(3), 176–185. <https://doi.org/10.1007/BF02618435>
- Derech-haim, S., Friedman, Y., Hizi, A., & Bakhanashvili, M. (2020). *p53 regulates its own expression by an intrinsic exoribonuclease activity through AU-rich elements*. 2.
- Di Martino, B., & Marsilio, F. (2010). Feline calicivirus VP2 is involved in the self-assembly of the capsid protein into virus-like particles. *Research in Veterinary Science*, *89*(2), 279–281. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.03.011>
- Di Martino, Barbara, Marsilio, F., & Roy, P. (2007). Assembly of feline calicivirus-like particle and its immunogenicity. *Veterinary Microbiology*, *120*(1–2), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.10.021>
- Ehresmann, D. W., & Schaffer, F. L. (1977). RNA synthesized in calicivirus-infected cells is atypical of picornaviruses. *Journal of Virology*, *22*(2), 572–576. <https://doi.org/10.1128/jvi.22.2.572-576.1977>
- Emmott, E., Sorgeloos, F., Caddy, S. L., Vashist, S., Sosnovtsev, S., Lloyd, R., ... Goodfellow, I. (2017). Norovirus-mediated modification of the translational landscape via virus and host-induced cleavage of translation initiation factors. *Molecular and Cellular Proteomics*, *16*(4), S215–S229. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.062448>
- Escobar-Herrera, J., Medina-Ramírez, F. J., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2007). A carboxymethyl-cellulose plaque assay for feline calicivirus. *Journal of Virological Methods*, *146*(1–2), 393–396. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2007.07.013>
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., ... Roberts, L. (2005). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Reports*, *6*(10), 968–972. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400510>
- Green, K. Y., Mory, A., Fogg, M. H., Weisberg, A., Belliot, G., Wagner, M., ... Sosnovtsev, S. V. (2002). Isolation of Enzymatically Active Replication Complexes from Feline Calicivirus-Infected Cells. *Journal of Virology*, *76*(17), 8582–8595.

- <https://doi.org/10.1128/jvi.76.17.8582-8595.2002>
- Grinberg, S., Teiblum, G., Rahav, G., & Bakhanashvili, M. (2010). p53 in cytoplasm exerts 3'→5' exonuclease activity with dsRNA. *Cell Cycle*, 9(12), 2442–2455. <https://doi.org/10.4161/cc.9.12.12053>
- Grossi, E., Sánchez, Y., & Huarte, M. (2016). Expanding the p53 regulatory network: LncRNAs take up the challenge. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(1), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.07.011>
- Gualberto, A., Hixon, M. L., Finco, T. S., Perkins, N. D., Nabel, G. J., & Baldwin, A. S. (1995). A proliferative p53-responsive element mediates tumor necrosis factor alpha induction of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *Molecular and Cellular Biology*, 15(6), 3450–3459. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.6.3450>
- Herbert, T. P., Brierley, I., & Brown, T. D. K. (1996). Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *Journal of General Virology*, 77(1), 123–127. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-1-123>
- Herbert, T. P., Brierley, I., & Brown, T. D. K. (1997). Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *Journal of General Virology*, 78(5), 1033–1040. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-5-1033>
- Hernández, B. A., Sandoval-Jaime, C., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2016). Nucleolin promotes in vitro translation of feline calicivirus genomic RNA. *Virology*, 489, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.12.001>
- Hsieh, J. C., Kuta, R., Armour, C. R., & Boehmer, P. E. (2014). Identification of two novel functional p53 responsive elements in the herpes simplex virus-1 genome. *Virology*, 460–461(1), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.019>
- Kaiser, W. J., Chaudhry, Y., Sosnovtsev, S. V., & Goodfellow, I. G. (2006). Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *Journal of General Virology*, 87(2), 363–368. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81456-0>
- Karakasiliotis, I., Vashist, S., Bailey, D., Abente, E. J., Green, K. Y., Roberts, L. O., ... Goodfellow, I. G. (2010). Polypyrimidine Tract Binding Protein Functions as a Negative Regulator of Feline Calicivirus Translation. *PLoS ONE*, 5(3), e9562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009562>
- Karimian, A., Ahmadi, Y., & Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair*, 42, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.008>
- Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, 170(6), 1062–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- Levine, A. J., & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer*, 9(10), 749–758. <https://doi.org/10.1038/nrc2723>
- Ma-Lauer, Y., Carbajo-Lozoya, J., Hein, M. Y., Müller, M. A., Deng, W., Lei, J., ... Von Brunn, A. (2016). P53 down-regulates SARS coronavirus replication and is targeted by the SARS-unique domain and PLpro via E3 ubiquitin ligase RCHY1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(35), E5192–E5201. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603435113>

- Makino, A., Shimojima, M., Miyazawa, T., Kato, K., Tohya, Y., & Akashi, H. (2006). Junctional Adhesion Molecule 1 Is a Functional Receptor for Feline Calicivirus. *Journal of Virology*, *80*(9), 4482 LP – 4490. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.9.4482-4490.2006>
- Mawatari, M., & Kato, Y. (2014). Norovirus Gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases: Clinical Case Studies*, 203–212. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416975-3.00016-9>
- McFadden, N., Bailey, D., Carrara, G., Benson, A., Chaudhry, Y., Shortland, A., ... Goodfellow, I. (2011). Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS Pathogens*, *7*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002413>
- Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A. E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., & Ziebuhr, J. (2006). Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(13), 5108–5113. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508200103>
- Mishra, P. A., & Laboratories, U. (2015). *p53: An overview*. (January 2013).
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., & Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, *69*(7), 1237–1245. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90644-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90644-R)
- Natoni, A., Kass, G. E. N., Carter, M. J., & Roberts, L. O. (2006). The mitochondrial pathway of apoptosis is triggered during feline calicivirus infection. *Journal of General Virology*, *87*(2), 357–361. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81399-0>
- Neil, J. D., & Mengeling, W. L. (1988). Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. *Virus Research*, *11*(January), 59–72.
- Neill, J. D., Reardon, I. M., & Heinrikson, R. L. (1991). Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. *Journal of Virology*, *65*(10), 5440–5447. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.10.5440-5447.1991>
- Ori, A., Zauberman, A., Doitsh, G., Paran, N., Oren, M., & Shaul, Y. (1998). p53 binds and represses the HBV enhancer: An adjacent enhancer element can reverse the transcription effect of p53. *EMBO Journal*, *17*(2), 544–553. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.2.544>
- Peñaflor-téllez, Y., Trujillo-uscanga, A., Escobar-almazán, J. A., & Gutiérrez-escolano, A. L. (2019). *Immune Response Modulation by Caliciviruses*. *10*(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02334>
- Portela, A., & Digard, P. (2002). The influenza virus nucleoprotein: A multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *Journal of General Virology*, *83*(4), 723–734. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-4-723>
- Purdie, K. J., Pennington, J., Proby, C. M., Khalaf, S., De Villiers, E. M., Leigh, I. M., & Storey, A. (1999). The promoter of a novel human papillomavirus (HPV77) associated with skin cancer displays UV responsiveness, which is mediated through a consensus p53 binding sequence. *EMBO Journal*, *18*(19), 5359–5369. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5359>
- Radford, A. D., Coyne, K. P., Dawson, S., Porter, C. J., & Gaskell, R. M. (2007). Feline calicivirus. *Veterinary Research*, *38*(2), 319–335.

- <https://doi.org/10.1051/vetres:2006056>
- Roberts, L. O., Al-Molawi, N., Carter, M. J., & Kass, G. E. N. (2008). *Apoptosis in cultured cells infected with Feline Calicivirus*.
- Royall, E., & Locker, N. (2016). Translational control during calicivirus infection. *Viruses*, 8(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/v8040104>
- Saha, T., Kar, R. K., & Sa, G. (2015). Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 117(2–3), 250–263. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.12.002>
- Samad, A., & Carroll, R. B. (1991). The tumor suppressor p53 is bound to RNA by a stable covalent linkage. *Molecular and Cellular Biology*, 11(3), 1598–1606. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.3.1598>
- Santos-Valencia, J. C., Cancio-Lonches, C., Trujillo-Uscanga, A., Alvarado-Hernández, B., Lagunes-Guillén, A., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2019). Annexin A2 associates to feline calicivirus RNA in the replication complexes from infected cells and participates in an efficient viral replication. *Virus Research*, 261, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2018.12.003>
- Sato, Y., & Tsurumi, T. (2013). Genome guardian p53 and viral infections. *Reviews in Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/rmv.1738>
- Seal, B. S., Ridpath, J. F., & Mengeling, W. L. (1993). Analysis of feline calicivirus capsid protein genes: Identification of variable antigenic determinant regions of the protein. *Journal of General Virology*, 74(11), 2519–2524. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-11-2519>
- Shen, Y., Wang, X., Guo, L., Qiu, Y., Li, X., Yu, H., ... Ma, Z. (2009). Influenza A virus induces p53 accumulation in a biphasic pattern. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(2), 331–335. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2009.03.018>
- Sosnovtsev, S., & Green, K. Y. (1995). RNA Transcripts Derived from a Cloned Full-Length Copy of the Feline Calicivirus Genome Do Not Require VpG for Infectivity. *Virology*, 210(2), 383–390. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1995.1354>
- Sosnovtsev, S. V., Garfield, M., & Green, K. Y. (2002). Processing Map and Essential Cleavage Sites of the Nonstructural Polyprotein Encoded by ORF1 of the Feline Calicivirus Genome. *Journal of Virology*, 76(14), 7060–7072. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.14.7060-7072.2002>
- Sosnovtsev, S. V., Prikhod'ko, E. A., Belliot, G., Cohen, J. I., & Green, K. Y. (2003). Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Research*, 94(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(03\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00115-1)
- Sosnovtsev, S. V., Sosnovtseva, S. A., & Green, K. Y. (1998). Cleavage of the Feline Calicivirus Capsid Precursor Is Mediated by a Virus-Encoded Proteinase. *Journal of Virology*, 72(4), 3051–3059. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.4.3051-3059.1998>
- Sosnovtseva, S. A., Sosnovtsev, S. V., & Green, K. Y. (1999). Mapping of the Feline Calicivirus Proteinase Responsible for Autocatalytic Processing of the Nonstructural Polyprotein and Identification of a Stable Proteinase-Polymerase Precursor Protein. *Journal of Virology*, 73(8), 6626–6633. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.8.6626-6633.1999>
- Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Cervantes-Salazar, M., Angel-Ambrocio, A. H., & del Angel, R. M. (2017). DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity

- through the impairment of AMPK phosphorylation: A potential antiviral target. *PLoS Pathogens*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006257>
- Stuart, A. D., & Brown, T. D. K. (2007).  $\alpha$ 2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *Journal of General Virology*, 88(1), 177–186. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82158-0>
- Subba-Reddy, C. V., Goodfellow, I., & Kao, C. C. (2011). VPg-Primed RNA Synthesis of Norovirus RNA-Dependent RNA Polymerases by Using a Novel Cell-Based Assay. *Journal of Virology*, 85(24), 13027–13037. <https://doi.org/10.1128/jvi.06191-11>
- Subba-Reddy, Chennareddy V., Yunus, M. A., Goodfellow, I. G., & Kao, C. C. (2012). Norovirus RNA Synthesis Is Modulated by an Interaction between the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase and the Major Capsid Protein, VP1. *Journal of Virology*, 86(18), 10138–10149. <https://doi.org/10.1128/jvi.01208-12>
- Teng, Y., Liu, S., Guo, X., Liu, S., Jin, Y., He, T., ... Tong, Y. (2017). An integrative analysis reveals a central role of P53 activation via MDM2 in Zika virus infection induced cell death. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(JUL), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00327>
- Thorne, L. G., & Goodfellow, I. G. (2014). Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology*, 95(Pt\_2), 278–291. <https://doi.org/10.1099/vir.0.059634-0>
- Turpin, E., Luke, K., Jones, J., Tumpey, T., Konan, K., & Schultz-Cherry, S. (2005). Influenza Virus Infection Increases p53 Activity: Role of p53 in Cell Death and Viral Replication. *Journal of Virology*, 79(14), 8802–8811. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.14.8802-8811.2005>
- Urban, C., Luttermann, C., Immunologie, I., & Riems, D.-G. (2020). Downloaded from <http://jvi.asm.org/> on May 19, 2020 at Cinvestav del IPN Downloaded from <http://jvi.asm.org/> on May 19, 2020 at Cinvestav del IPN. (May). <https://doi.org/10.1128/JVI.00280-20>
- Vinje, J., Estes, M. K., Esteves, P., Green, K. Y., Katayama, K., Knowles, N. J., ... White, P. A. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *Journal of General Virology*, 1469–1470. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001332>
- Wang, B., Lam, T. H., Soh, M. K., Ye, Z., Chen, J., & Ren, E. C. (2018). Influenza A virus facilitates its infectivity by activating p53 to inhibit the expression of interferon-induced transmembrane proteins. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01193>
- Wang, Xiaodu, Deng, X., Yan, W., Zhu, Z., Shen, Y., Qiu, Y., ... Ma, Z. (2012). Stabilization of p53 in Influenza A Virus-infected Cells Is Associated with Compromised MDM2-mediated Ubiquitination of p53. *Journal of Biological Chemistry*, 287(22), 18366–18375. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.335422>
- Wang, Xiaodu, Shen, Y., Qiu, Y., Shi, Z., Shao, D., Chen, P., ... Ma, Z. (2010). The non-structural (NS1) protein of influenza A virus associates with p53 and inhibits p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 395(1), 141–145. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.03.160>
- Wang, Xue, Tan, J., Zoueva, O., Zhao, J., Ye, Z., & Hewlett, I. (2014). Novel pandemic influenza A (H1N1) virus infection modulates apoptotic pathways that impact its replication in A549 cells. *Microbes and Infection*, 16(3), 178–186.

- <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.11.003>
- Wei, L., Huhn, J. S., Mory, A., Pathak, H. B., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., & Cameron, C. E. (2001). Proteinase-Polymerase Precursor as the Active Form of Feline Calicivirus RNA-Dependent RNA Polymerase. *Journal of Virology*, *75*(3), 1211–1219. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.3.1211-1219.2001>
- Willcocks, M. M., Carter, M. J., & Roberts, L. O. (2004). Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF4G and inhibition of host-cell protein synthesis during feline calicivirus infection. *Journal of General Virology*, *85*(5), 1125–1130. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19564-0>
- Yang, M. R., Lee, S. R., Oh, W., Lee, E. W., Yeh, J. Y., Nah, J. J., ... Song, J. (2008). West Nile virus capsid protein induces p53-mediated apoptosis via the sequestration of HDM2 to the nucleolus. *Cellular Microbiology*, *10*(1), 165–176. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01027.x>
- Yuan, L., Chen, Z., Song, S., Wang, S., Tian, C., Xing, G., ... Zhang, L. (2015). P53 degradation by a coronavirus papain-like protease suppresses type I interferon signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(5), 3172–3182. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619890>
- Yumiketa, Y., Narita, T., Inoue, Y., Sato, G., Kamitani, W., Oka, T., ... Tohya, Y. (2016). Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation. *Veterinary Microbiology*, *185*, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.02.005>