



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**Efecto de la palmitoilación de proteínas del calicivirus felino  
(FCV) durante el ciclo de replicación.**

**T E S I S**

QUE PRESENTA

**IF. JAURY GÓMEZ DE LA MADRID**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

EN

**INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

DIRECTORA

**DRA. ANA LORENA GUTIÉRREZ ESCOLANO**

CIUDAD DE MÉXICO.

JULIO, 2023.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 9 de Virología, bajo la dirección de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, profesora e investigadora titular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y la asesoría de la Dra. Rosa María del Ángel y el Dr. José Luis Rosales Encina, ambos investigadores del Departamento

*Me dijiste que no íbas a lograr verme terminar la carrera, lo hiciste. Me dijiste que no íbas alcanzar a verme  
terminar la maestría... casi lo logramos. Estoy seguro de que te voy a recordar toda la vida, porque no hay día  
que no me acuerde de ti. Gracias por todo.*

*Esto es para ti.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por su apoyo económico en la realización de este trabajo como parte del Proyecto 302965, PRONAI 3: Infecciones virales del tracto gastrointestinal.

A la Dra. Lorena por permitirme ser parte de su grupo de trabajo sin dudarlo, también por su asesoría, pero sobre todo por la paciencia, tiempo, consejos y comprensión durante este tiempo de trabajo en el laboratorio. Por las llamadas de atención cuando fueron requeridas, sin duda muy necesarias. Por ser una excelente directora y mucho mejor persona.

A mis asesores, por el tiempo dedicado a la revisión del proyecto cuando los tiempos se complicaban; su flexibilidad y comprensión fueron de mucha ayuda en la parte final del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio por su ayuda y paciencia durante todo este tiempo en el laboratorio, también por los consejos y observaciones en los múltiples ensayos de presentación que tuvieron que aguantar.

A mi familia, particularmente en los tiempos tan complicados que se presentaron durante el camino, nunca deje de sentir su apoyo incondicional. A mis papás que a pesar de todo están siempre, no fue fácil. A mi mamá y mi tía, por su fortaleza en los momentos más difíciles, sin importar la situación lograron salir adelante. A mi papá, a pesar de las situaciones siempre buscaste la manera de sacarnos adelante. A Sienita, por ser la mejor, fuiste más de una vez una motivación y no dudes que vas a poder con todo. Mamá, papá, tía, mamá Ruti, Siena los amo y es por ustedes.

A Day, por aguantarme todo este tiempo, no debe ser fácil. Gracias por estar en el momento más complicado hasta ahora. Quédate siempre. Te amo.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	7
ABSTRACT .....	8
<b>1.1    Familia <i>Caliciviridae</i></b> .....	9
<b>1.1.1    Estructura y organización genómica de los calicivirus</b> .....	10
<b>1.2    Calicivirus felino</b> .....	11
<b>1.2.1    Genoma del FCV</b> .....	11
<b>1.2.2    Ciclo de replicación del FCV</b> .....	13
<b>1.2.3    Rol de las proteínas no estructurales en la replicación viral</b> .....	15
<b>1.3    Modificaciones postraduccionales en el FCV y otros calicivirus</b> .....	15
<b>1.3.1    Palmitoilación de proteínas.</b> .....	16
<b>1.3.2    Funciones celulares de la palmitoilación de proteínas.</b> .....	17
<b>1.3.3    Enzimas implicadas en la palmitoilación de proteínas</b> .....	18
<b>1.3.4    Palmitoilación de proteínas virales</b> .....	19
<b>1.3.5    Intercambio acil-biotina como método de detección de proteínas palmitoiladas</b> ..	20
<b>2.    JUSTIFICACION</b> .....	22
<b>3.    HIPOTESIS</b> .....	22
<b>4.    OBJETIVOS</b> .....	22
<b>5.    MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
<b>5.1    Análisis <i>in silico</i> de las proteínas NS3 y LC</b> .....	23
<b>5.2    Diseño de primers para NS3 FCV</b> .....	23
<b>5.3    Construcción y propagación del vector de transito</b> .....	24
<b>5.4    Extracción de DNA plasmídico y liberación del fragmento de NS3</b> .....	25
<b>5.5    Cultivo celular</b> .....	26
<b>5.6    Infección viral con FCV</b> .....	26
<b>5.7    Ensayo de viabilidad celular con 2-BP</b> .....	26
<b>5.8    Tratamiento con el inhibidor 2-BP</b> .....	27
<b>5.9    Extractos protéicos</b> .....	27
<b>5.10    Inmunoprecipitación de proteínas virales</b> .....	27
<b>5.11    Intercambio acil-biotina (ABE)</b> .....	28
<b>5.12    Análisis por Western Blot</b> .....	28

5.13	Evaluación de la producción de partículas virales por plaqueo.....	28
5.14	Ensayos de Inmunofluorescencia.....	29
5.15	Fraccionamiento núcleo-citoplasma .....	29
6.	RESULTADOS.....	31
6.1	Identificación <i>in silico</i> de los sitios de palmitoilación de NS3 y LC de FCV URB.....	31
6.2	Predicción de hélices transmembranas (HTM) en NS3 y LC de FCV URB .....	32
6.3	Modelado tridimensional de las proteínas NS3 y LC del FCV .....	34
6.4	Conservación de los sitios de palmitoilación de NS3 de otros vesivirus .....	37
6.5	Viabilidad celular en presencia del inhibidor 2-BP .....	39
6.6	El efecto citopático producido por FCV disminuye en presencia de 2-BP.....	39
6.7	Efecto del 2-BP en la síntesis de proteínas .....	40
6.8	Localización subcelular de NS3 con el inhibidor 2-BP .....	42
6.9	Relocalización nuclear de NS3 .....	43
6.10	Efecto del inhibidor 2-BP en la producción de partículas virales.....	44
6.11	Inmunoprecipitación de NS3.....	46
6.12	Clonación de NS3 en el vector de tránsito.....	47
6.13	Inmunoprecipitación de la proteína LC.....	49
6.14	Detección de la palmitoilación de LC .....	49
7.	DISCUSIÓN.....	51
8.	CONCLUSIONES.....	58
9.	PERSPECTIVAS .....	59
10.	REFERENCIAS .....	59

## RESUMEN

Los calicivirus son virus pequeños, de 27 a 40 nm de diámetro, no envueltos con un genoma de RNA polaridad positiva. Los que infectan a humanos, clasificados en los géneros Sapovirus y Norovirus, representan un problema de salud pública mundial debido a que causan cerca del 20% de los brotes de gastroenteritis agudas. Su estudio se encuentra limitado por las complicaciones que conlleva su cultivo en el laboratorio. El *Calicivirus felino* (FCV) es el modelo más utilizado de la familia *Caliciviridae* para entender los mecanismo y la biología del virus, ya que puede propagarse en cultivo celular y se cuenta con un sistema de genética reversa. El FCV codifica proteínas no estructurales que durante la infección se localizan en las membranas del Retículo Endoplásmico (RE) e induce su proliferación, sin embargo, carecen de señales que le permitan esa localización y hasta la fecha se desconoce el mecanismo por el cual llegan a este organelo. Algunas modificaciones postraduccionales (PTM), como la palmitoilación, permiten la asociación de proteínas a las membranas celulares, por lo que en este trabajo se investigó si algunas proteínas virales son susceptibles de esta PTM. Mediante análisis bioinformáticos se determinó que varias proteínas virales son susceptibles a ser palmitoiladas; ente ellas la NS3 (helicasa y NTPasa) y la proteína Líder de la Cápside (LC), en las que se identificaron sitios de palmitoilación, hélices transmembrana (HTM). Así mismo, se identificó una secuencia de localización nuclear (NLS) en NS3. También, analizamos los efectos de la palmitoilación durante el ciclo de replicación del FCV, identificamos una reducción en el efecto citopático, la síntesis de proteínas virales y la producción de partículas virales que puede deberse a un efecto indirecto, sobre la palmitoilación de proteínas celulares necesarias para estos procesos o directo sobre las proteínas virales. Mediante un fraccionamiento núcleo-citoplasma demostramos que NS3 se localiza en el núcleo cuando se inhibe la palmitoilación. Por último, demostramos la palmitoilación *in vitro* de LC mediante la técnica de intercambio acil-biotina (ABE). Los datos generados en este trabajo proporcionan información sobre la importancia de la palmitoilación durante el ciclo replicativo del FCV.

## **ABSTRACT**

Caliciviruses are small, non-enveloped viruses with a genome of positive-sense RNA, measuring 27 to 40 nm in diameter. Those that infect humans, classified into the Sapovirus and Norovirus genera, pose a global public health problem as they account for approximately 20% of acute gastroenteritis cases. Their study is limited due to the complexities associated with culturing them in the laboratory. Feline Calicivirus (FCV) serves as the most widely used model within the Caliciviridae family for understanding the biology of caliciviruses, as it can propagate in cell culture and has a reverse genetics system. FCV encodes non-structural proteins that localize to the Endoplasmic Reticulum (ER) membranes during infection, inducing their proliferation. However, they lack signals that enable this localization, and the mechanism by which they arrive at this organelle remains unknown. Some post-translational modifications (PTMs), such as palmitoylation, facilitate the association of proteins with cellular membranes. Hence, this study investigated whether some viral proteins are susceptible to palmitoylation. Using bioinformatic tools, it was determined that several viral proteins, including NS3 (helicase and NTPase) and the Capsid Leader protein (LC), are susceptible to palmitoylation. Palmitoylation sites and transmembrane helices (TMH) were identified in these proteins. Additionally, a nuclear localization sequence (NLS) was found in NS3. The effects of palmitoylation during the FCV replication cycle were also analyzed. A reduction in cytopathic effect, viral protein and particle production was observed, which may be attributed to an indirect effect on palmitoylation of cellular proteins essential for these processes, or a direct effect on viral proteins. Subcellular fractionation revealed that NS3 localizes in the nucleus when palmitoylation is inhibited. Finally, *in vitro* palmitoylation of LC was demonstrated using the acyl-biotin exchange (ABE) technique. The data generated in this study provide insights into the significance of palmitoylation during the FCV replication cycle.

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Familia Caliciviridae

La familia *Caliciviridae* está formada por 11 géneros actualmente aceptados: *Norovirus*, *Sapovirus*, *Vesivirus*, *Nebovirus*, *Lagovirus*, *Recovirus*, *Valovirus*, *Bavovirus*, *Nacovirus*, *Minovirus* y *Salovirus*. Los miembros de esta familia infectan a una gran variedad de hospedadores vertebrados. Los virus de los 7 primeros géneros infectan a diversos mamíferos, los *Bavovirus* y *Nacovirus* son específicos de aves y los dos restantes de peces (Vinjé et al., 2019) (Desselberger, 2019).

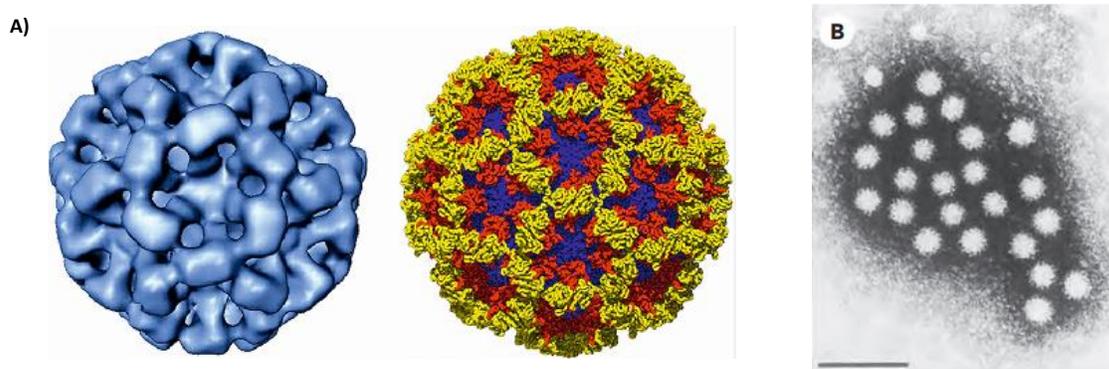
Todos los miembros de la familia *Caliciviridae* causan infecciones específicas de especie, las cuales producen en los hospedadores una serie de síntomas diferentes, desde infecciones leves o asintomáticas hasta sistémicas graves o gastroenteritis severas (Vinjé et al., 2019) (Smertina, Hall, Urakova, Strive, & Frese, 2021). Los *Norovirus* y *Sapovirus* son los principales patógenos humanos en la familia y particularmente los norovirus, son responsables del 18 % de los casos de gastroenteritis aguda, lo cual se traduce en más de 684 millones de casos y 200 mil muertes al año a nivel mundial (Goodfellow & Taube, 2016) (Mahar, Bok, Green, & Kirkwood, 2013).

Aunque el estudio y entendimiento de la biología y los mecanismos patogénicos de los Norovirus humanos (HuNV) se ha visto muy limitado debido a la escases de sistemas de cultivo celular y modelos animales eficientes y bien establecidos, el *Calicivirus felino* (FCV) y el *Norovirus murino* (MNV) se han convertido en dos de los modelos *in vitro* base para entender y dilucidar los mecanismos moleculares y biológicos detrás de las infecciones producidas por estos virus (Sandoval-Jaime, Green, & Sosnovtsev, 2015) (Hongxia et al., 2021).

Debido al desarrollo de sistemas de genética reversa, el estudio de ambos modelos ha cobrado importancia en el entendimiento de los HuNV y la familia *Caliciviridae* (Sosnovtsev & Green, 2003) (Oka, Takagi, & Tohya, 2014).

### 1.1.1 Estructura y organización genómica de los calicivirus

Los calicivirus, son virus pequeños (27 a 40 nm de diámetro) no envueltos con geometría icosaédrica (Figura 1). Su cápside está formada por 90 dímeros de la proteína mayoritaria de cápside (VP1) y algunas copias de la proteína minoritaria de cápside (VP2) (Vinjé et al., 2019).



**Figura 1. Morfología y estructura de la cápside de los calicivirus.** A) Reconstrucción de crio imagen y estructura de rayos X del virus Norwalk del género Norovirus. B) Micrografía electrónica de aislados del virus Norwalk (género Norovirus). Recuperado de Vinjé et al., 2019.

Su genoma está constituido por un RNA de sentido positivo de 7.4 a 8.3 kb, el cual se presenta típicamente en 3 marcos abiertos de lectura u ORF (open reading frame, por sus siglas en inglés) (Mahar et al., 2013). El genoma se encuentra unido covalentemente en su extremo 5' a la proteína VPg (viral protein genome-linked, por sus siglas en inglés), que promueve y regula la traducción viral, jugando un papel fundamental en este proceso (Goodfellow, 2011). Además, estos virus codifican un RNA subgenómico (sgRNA) que se produce de manera tardía y a partir del cual se generan las proteínas estructurales. Los extremos de ambos RNAs (gRNA y sgRNA) están flanqueados por regiones no traducidas (UTR); los extremos 3' de ambas moléculas de RNA están poliadeniladas (Meyers, Wirblich, & Thiel, 1991).

Los calicivirus codifican en su ORF1, a una poliproteína que posteriormente es escindida por la proteasa viral para dar lugar a la formación de las proteínas no estructurales (NS), mientras que las proteínas de la cápside o estructurales (VP1 y VP2), a pesar de estar codificadas en el gRNA, se producen mayoritariamente a partir del sgRNA. (Desselberger, 2019) (Smertina et al., 2021).

Son 6 las proteínas virales no estructurales maduras las generadas a partir de la poliproteína: NS1, NS2, NS3 o NTPasa, NS4, NS5 o VPg, NS6 o proteasa y NS7 o polimerasa dependiente de RNA. (Clarke & Lambden, 1997). Sin embargo, en algunos casos Ns1/2 (MNV) o NS6/7 (FCV) se producen sin ser procesadas. Entre las proteínas estructurales, la VP1 es la más abundante del virión, lo cual está relacionado con el fenotipo antigénico del virión. La proteína estructural VP2 tiene una distribución diferente a VP1, se encuentra presente en menor proporción por virión y su rol dentro del ciclo de replicación no está claro, aunque se sabe que en la infección por el FCV participa durante el escape endosomal del gRNA y es necesaria para la producción de viriones infecciosos (Sosnovtsev, Belliot, Chang, Onwudiwe, & Green, 2005). En Norovirus es necesaria la presencia de VP2 para la infección y no para el ensamblaje del virión (Vongpunsawad, Prasad Venkataram, & Estes, 2013)

## **1.2 Calicivirus felino**

El FCV es un patógeno ampliamente distribuido entre los felinos domésticos y salvajes. Es altamente contagioso, en particular entre poblaciones de gatos y se ha establecido como un agente ubicuo en estos animales en todo el mundo (A. D. Radford, Coyne, Dawson, Porter, & Gaskell, 2007) (Pesavento, Chang, & Parker, 2008).

En la mayoría de los casos este parásito causa una enfermedad de vías respiratorias superiores, la cual se presenta de forma aguda, moderada y autolimitante; sin embargo, existen reportes de cepas más virulentas que ocasionan poliartritis y úlceras mucocutáneas (Bordicchia et al., 2021), con una alta mortalidad en animales adultos donde las vacunas no ofrecen ninguna protección (A. Radford et al., 2009).

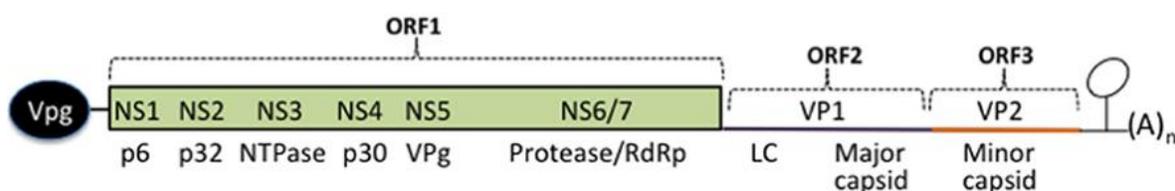
### **1.2.1 Genoma del FCV**

El FCV pertenece al género *Vesivirus*, su genoma es de RNA monocatenario de sentido positivo con un tamaño de 7.7 kb. La región 5' UTR tiene una longitud de 4 a 19 nucleótidos (nt) mientras que la región 3' UTR es de 46 a 108 nt (Goodfellow & Taube, 2016) (Bordicchia

et al., 2021). Ambas son importantes para la regulación de la replicación, traducción y patogénesis viral (Bailey, Karakasiliotis, et al., 2010).

El FCV tiene organizado su genoma en tres ORF (Figura 2), el primero da lugar a una poliproteína que posteriormente es escindida por la proteasa viral (NS6/7) para generar 6 proteínas no estructurales: NS1, NS2, NS3 o NTPasa, NS4, NS5 o VPg y NS6/7 o la proteasa-polimerasa. Las funciones de NS1, NS2 y NS4 aún no se encuentran del todo claras, pero estudios previos han logrado la identificación de NS2 y NS4 de FCV en los complejos de replicación (CR), proponiendo su participación en su formación (Bailey, Kaiser, et al., 2010).

El ORF 2 codifica a la proteína VP1 en forma de un precursor denominado LC-VP1, que al ser procesada por la proteasa viral NS6/7 genera a la proteína VP1 madura principal componente de las cápsides virales y a la proteína Líder de la cápside (LC) que tiene un papel importante en el efecto citopático durante la infección y en la inducción de la apoptosis en un contexto de transfección (Abente et al., 2013) (Barrera-Vázquez, Cancio-Lonches, Hernández-González, et al., 2019). La proteína VP1 madura es la encargada de interactuar con su receptor fJAM-1 (Feline Junctional adhesión molecule 1) en la membrana celular, provocando un cambio en la estructura icosaédrica del virión para su ingreso a la célula (Bhella & Goodfellow, 2011).



**Figura 2. Organización genómica de FCV.** Se observa la organización del genoma del FCV y las proteínas estructurales y no estructurales codificadas en cada ORF. Recuperado de (Peñaflor-Téllez, Trujillo-Uscanga, Escobar-Almazán, & Gutiérrez-Escolano, 2019).

El ORF 3 genera a la proteína minoritaria de la cápside (VP2) la cual se encuentra en menor proporción que VP1 en los viriones infectivos (de una a diez copias por virión) y tanto VP1 como VP2 se producen a partir del sgRNA. VP2 participa en la formación de un canal/poro para el escape endosomal del virus (Conley et al., 2019), también se ha observado que la

presencia de VP2 es necesaria para la maduración de viriones infecciosos (Sosnovtsev et al., 2005).

## **1.2.2 Ciclo de replicación del FCV**

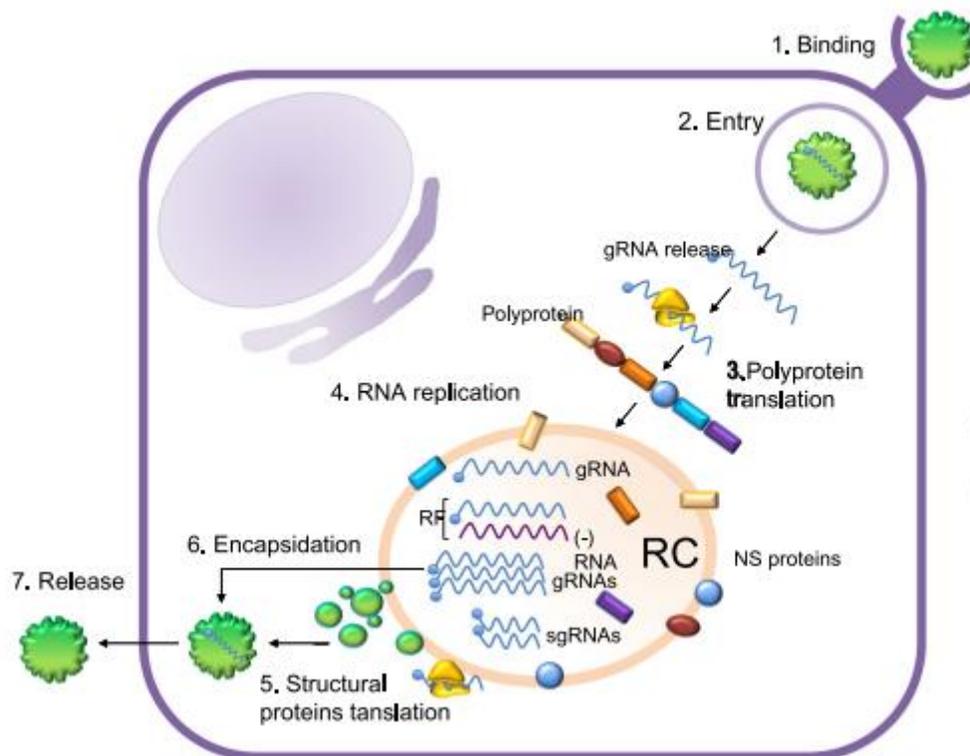
### **Unión y entrada**

La entrada viral es un proceso complejo y detallado (Figura 3), que abarca desde la unión o interacción del virión con la célula, hasta la liberación del genoma en el citoplasma. El primer paso en el ciclo de replicación del FCV es la interacción del virión con la superficie de la célula hospedadora, dicha interacción esta mediada y favorecida por diferentes moléculas accesorias o de unión, una de ellas es el ácido siálico y este aumenta la tasa de entrada viral (Graziano, Wei, & Wilen, 2019). El siguiente paso crítico es la interacción del virión con la molécula fJAM-1, la cual se ha descrito como su receptor protéico (Akiko et al., 2006), posterior a lo cual se desencadena un proceso de endocitosis mediada por clatrina y dependiente de receptor y del pH para la acidificación endosomal. Cuando se da la interacción de la partícula viral con su receptor fJAM-1 se genera un cambio conformacional en la proteína VP1 que termina con la exposición de la proteína VP2 y su posterior ensamble en una estructura similar a un canal o portal permitiendo la penetración de la membrana endosomal con ayuda del dominio hidrofóbico de VP2 y permitiendo así la salida del genoma viral hacia el citoplasma celular (Conley et al., 2019).

Una vez liberado el genoma en el citoplasma celular se lleva a cabo la traducción del RNA cuando la proteína VPg es reconocida por los factores canónicos de inicio de la traducción celular, dando como resultado una poliproteína que será procesada por la propia proteasa viral en 6 proteínas no estructurales: NS1, NS2, NS3 o helicasa, NS4, NS5 o VPg y NS6/7 o proteasa-polimerasa. Las proteínas no estructurales generan un ambiente propicio para potenciar la traducción viral y llevan a la célula a un fenotipo patógeno caracterizado por la formación de complejos membranosos llamados “fábricas de replicación” o “CR” que son pequeñas invaginaciones en las membranas de organelos como RE y Golgi (Bailey, Kaiser, et al., 2010), en donde por acción de la proteasa/polimerasa NS6/7 se genera una molécula intermediaria de RNA (-) para la producción múltiples de moléculas de gRNA que

constituyen el genoma de la progenie viral y el sgRNA, a partir del cual se traducen las proteínas estructurales VP1 y VP2 (Doerflinger et al., 2017). El gRNA y en ocasiones el sgRNA son ensamblados de manera concomitante a la formación de las cápsides virales, constituida por 90 dímeros de la proteína VP1 y cerca de 10 copias de VP2 (Green, Aaron, et al., 2002).

Finalmente, la liberación y propagación de las partículas virales en el hospedero y la infección de las células vecinas se ha asociado a la apoptosis. Reportes recientes han apuntado a las vesículas extracelulares como portadores de material genético y posiblemente partículas virales infecciosas (Mizenko, Brostoff, Jackson, Pesavento, & Carney, 2022) (Goodfellow & Taube, 2016).



**Figura 3. Ciclo replicativo del FCV.** El ciclo de replicación del FCV comienza con la unión a su receptor fJAM-1 y posteriormente se produce la endocitosis mediada por clatrina, una vez dentro de la célula libera su genoma en el citoplasma celular y así comienza la traducción de las proteínas no estructurales que se encargan de producir CR en los que se generan los genomas de la progenie viral y los sgRNA a partir de los cuales se generan las proteínas estructurales que se ensamblan de manera concomitante con los gRNA para producir las partículas virales maduras que se propagan en el hospedero mediante la apoptosis. Tomado de Peñaflo-Téllez et al, 2022.

### **1.2.3 Rol de las proteínas no estructurales en la replicación viral**

Como todos los virus de RNA de sentido positivo, los calicivirus inducen la proliferación de las membranas celulares para favorecer un entorno que permita su replicación. La alteración en el tráfico de membranas tiene como consecuencia la generación de invaginaciones en forma de sacos, conocidas como CR, para la generación de los RNAs virales y en ocasiones la morfogénesis viral. (Revisado en Romero-Brey & Bartenschlager, 2014).

En los CR del FCV se ha identificado la presencia de todas las proteínas no estructurales. Las proteínas NS2, NS3 y NS4 tienen roles potenciales como el reclutamiento de membranas o el anclaje de la maquinaria de replicación del RNA (Green, Mory, et al., 2002) (Kaiser, Chaudhry, Sosnovtsev, & Goodfellow, 2006). NS6/7 además de participar en la síntesis de los gRNAs y sgRNAs también tiene un papel junto con NS3, NS4 y las proteínas estructurales en la formación de los CR (Bailey, Kaiser, et al., 2010).

### **1.3 Modificaciones postraduccionales en el FCV y otros calicivirus**

Las modificaciones postraduccionales (PTM, por sus siglas en inglés) consisten en una serie de procesos en los cuales una proteína es modificada covalentemente por la acción de diversas enzimas durante o después de su síntesis y que se relacionan con su localización subcelular y función. En las infecciones virales, las PTMs que se producen sobre las proteínas virales participan en diferentes pasos de la replicación viral, incluyendo la liberación y en la inhibición de la respuesta inmune del hospedador debido a las “nuevas” características que las proteínas adoptan (Revisado en Kumar, Mehta, Mishra, Nayak, & Sunil, 2021).

En relación con las PTMs que sufren las proteínas de los calicivirus, se ha reportado que la polimerasa NS7 de los norovirus se fosforila por acción de la cinasa AKT en la treonina (Thr) 33 para hacer más eficiente su actividad enzimática, ya que en mutantes Thr33Glu tienen una menor unión al sustrato y una velocidad enzimática máxima 100 veces menor, en comparación con la silvestre (Eden, Sharpe, Whit, & Brown, 2011). Por otro lado, en la proteína NS5 o VPg de FCV también se han identificados sitios de fosforilación en serina en las posiciones 80 y 107, de los cuales sus efectos en la regulación de la proteína aún no están

establecidos (Olspert et al., 2016). Sin embargo, no es mucho lo que se conoce a cerca de otro tipos de PTM en estas proteínas virales.

Sabemos que muchas de las proteínas no estructurales de los calicivirus, y de los virus en general, se asocian con membranas celulares, particularmente durante la formación de los CR. Una de las PTM que contribuye con la asociación de proteínas a membranas es la palmitoilación, que aumenta la hidrofobicidad a través de la unión covalente de ácidos grasos, particularmente el ácido palmítico, en cisteínas y en menor proporción en serinas y treoninas. Asimismo, esta PTM también parece tener un papel en el tráfico subcelular de proteínas entre compartimentos membranosos y en la modulación de interacciones proteína-proteína, todas ellas funciones que desempeñan las proteínas virales. Estudios *in silico* desarrollados en nuestro laboratorio por Peñaflor-Téllez (datos no publicados) muestran que las proteínas NS2, NS3, NS4, NS6/7 y LC de FCV son candidatas a palmitoilación en residuos de cisteína. De igual manera, LC presenta sitios putativos de fosforilación y capacidad de oligomerización, la cual ya fue demostrada (Peñaflor-Téllez, Chávez-Munguía, Lagunes-Guillén, Salazar-Villatoro, & Gutiérrez-Escolano, 2022). Sin embargo, los efectos de la palmitoilación durante la infección, replicación y ensamblaje del FCV aún se desconocen.

### **1.3.1 Palmitoilación de proteínas.**

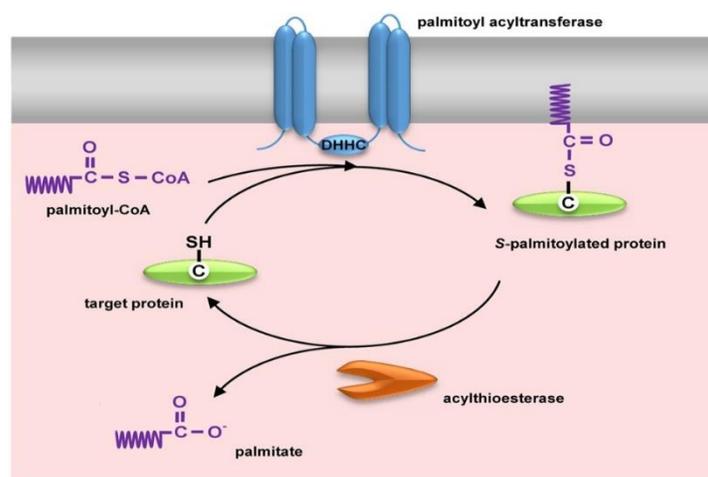
De manera general la palmitoilación es una modificación postraduccional de proteínas transmembranales y periféricas, donde se unen moléculas lipídicas a proteínas blanco por medio de un enlace covalente, esta unión va a modificar las propiedad “originales” de la proteína como su localización, hidrofobicidad, conformación e incluso la unión a otras proteínas. Existen diversas acilaciones en las células eucariotas donde el enlace formado resulta estable y no reversible como la miristoilación, prenilación u o-acilación, sin embargo, la s-palmitoilación es la modificación postraduccional lipídica más común y se encuentra presente en todos las células eucariotas, donde una molécula de ácido palmítico saturado (16 carbonos) se une de manera reversible a un (o unos) residuo de cisteína mediante un enlace tioéster, por medio de procesos de palmitoilación y de-palmitoilación finamente controlados (Li et al., 2022) (Zaballa & van der Goot, 2018). Generalmente esta modificación ocurre en

los residuos de cisteínas próximos o dentro de las regiones transmembranales o citoplásmicas de las proteínas (Blaskovic, Blanc, & van der Goot, 2013).

### 1.3.2 Funciones celulares de la palmitoilación de proteínas.

La palmitoilación de proteínas, al igual que otras modificaciones postraduccionales como la fosforilación o la acilación, al ser un proceso reversible (Figura 4) y controlado permite actuar como switch molecular en diversos procesos y vías como lo son el tráfico molecular o la señalización celular (Sobocinska, Roszczenko-Jasinska, Ciesielska, & Kwiatkowska, 2018).

En general, la palmitoilación provoca cambios en la localización, estructura y función de las proteínas. Uno de los cambios más notorios ocurre con proteínas citosólicas, ya que esta modificación les permite adquirir un anclaje hidrofóbico aumentado su afinidad con las membranas celulares y de los organelos, y como consecuencia su localización y tráfico subcelular también se ve modificado (Li et al., 2022).



**Figura 4. Ciclo de palmitoilación/de-palmitoilación de proteínas.** Las enzimas PAT (palmitoil acil transferasas) transfieren al palmitato desde palmitoil-CoA hacia la proteína blanco y se encuentran ancladas a la membrana mientras que las APT (acilprotein tioesterasas) son citosólicas para hidrolizar el enlace tioéster formado. Recuperado de Sobocinska et al., 2018.

Se han realizados diversos estudios sobre la palmitoilación de proteínas y sus efectos en procesos celulares y fisiológicos como la plasticidad sináptica, metabolismo, conformación

de membranas, polaridad, migración celular, apoptosis, inmunidad celular o la conformación de nano dominios o balsas en las membranas. Dejando en claro la importancia de la palmitoilación de proteínas para los diversos procesos celulares así como en las patologías asociadas a las desregulaciones de los procesos de palmitoilación/de-palmitoilación como en la enfermedad de Huntington, Alzheimer y esquizofrenia e incluso en las infecciones bacterianas y virales (Sobocinska et al., 2018) (Cho & Park, 2016).

### **1.3.3 Enzimas implicadas en la palmitoilación de proteínas**

Debido a las bajas concentraciones de ácido palmítico libre en las células (en forma de palmitoil-CoA), la palmitoilación de proteínas no puede ocurrir de forma espontánea y requiere la participación de enzimas que catalicen dichas reacciones. Las enzimas que participan en la adición del ácido palmítico son denominadas palmitoil aciltransferasas (PAT) y por otro lado, las que participan en la eliminación del ácido palmítico son las acilprotein tioesterasas (APT) y palmitoilprotein tioesterasas (PPT) (Li et al., 2022) (Blaskovic et al., 2013).

Hasta la fecha se han descrito 23 PAT en humanos que comparten una localización subcelular en las membranas del RE y del Golgi, aunque también existen reportes de PAT en membranas endosomales y vesículas sinápticas (Korycka et al., 2012). El centro catalítico de las PAT está conformado por un dominio conservado rico en cisteína DHHC (Asp-His-His-Cys) y una región de unión a zinc. Las PAT contienen al menos cuatro regiones transmembrana, aunque 2 de las 23 contienen seis regiones transmembrana. Estas enzimas son muy variadas en la región N-terminal o la región citosólica, ya que contienen diferentes y múltiples motivos de unión a proteínas (Cho & Park, 2016).

La de-palmitoilación es un proceso menos entendido, partiendo de que hasta ahora únicamente se han identificado siete APT, estas catalizan la hidrólisis del enlace tioéster formado en la palmitoilación y a diferencia de las PAT, se ubican en el citosol y en los lisosomas (Sobocinska et al., 2018) (Korycka et al., 2012).

### 1.3.4 Palmitoilación de proteínas virales

Los virus no tienen la maquinaria necesaria para sintetizar las enzimas responsables de la palmitoilación de proteínas; sin embargo, como lo hacen con la mayoría de los procesos que requieren, utilizan la maquinaria de esta modificación postraduccional propia de las células para modificar sus proteínas y así poder mejorar sus propiedades de replicación, ensamblaje o patogenicidad viral (Li et al., 2022).

Se han reportado múltiples proteínas virales que son palmitoiladas, la mayoría de ellas son transmembranales que se encuentran en las membranas de los diferentes virus envueltos, algunos ejemplos de estas son: la hemaglutinina (HA) y la proteína de matriz 2 (M2) del virus de la influenza, la proteína S de SARS-CoV, la proteína de fusión (F) del virus de sarampión y recientemente la proteína spike de SARS-CoV-2. Estas modificaciones en las proteínas proveen a los virus de mejoras en la formación de su envoltura y en el proceso de gemación (Z. Wu et al., 2021) (Veit, Serebryakova, & Kordyukova, 2013).

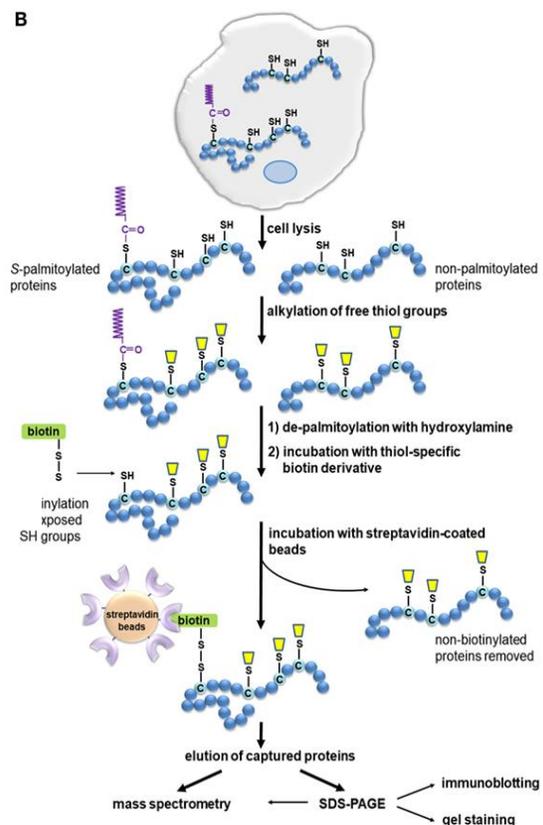
Si bien el estudio de la palmitoilación de proteínas virales se ha centrado más en las proteínas estructurales (como las mencionadas en el párrafo anterior), existen reportes de proteínas no estructurales que también son blanco de la palmitoilación. Dos ejemplos descritos son las proteínas NSP1 del virus de Chikungunya (CHIKV) y NS2 del virus de la hepatitis C (HCV) donde la palmitoilación resulta de suma importancia para tener una replicación del genoma viral exitosa mediante el anclaje de los CR a las membranas de los organelos (RE y Golgi) (Zhang, Zhao, & Zhang, 2019) (M. Wu, Shanmugam, Welsch, & Yi, 2019). Otro ejemplo es la proteína NSP1 del virus Sindbis que forma parte del complejo de replicación, donde la palmitoilación es requerida para reforzar su unión a la membrana; mutaciones en los residuos de cisteína que son palmitoilados atenúan la replicación del virus y disminuyen los niveles de RNA sintetizado. Algo que llama la atención es que se generan mutaciones compensatorias en sitios distintos de la proteína que permiten de nuevo la palmitoilación dando como resultado una mayor infección (Veit, 2012).

Las proteínas pequeñas anfipáticas con actividad de canal iónico (viroporinas clásicas) también son blancos de palmitoilación, si bien los reportes no son tan abundantes existen ejemplos claros donde la palmitoilación de estas viroporinas favorecen a la replicación viral.

Por ejemplo, la proteína M2 del virus de la influenza A participa en la liberación del genoma hacia el citoplasma celular y en la gemación del virus. Cuando se pierden los sitios de palmitoilación en esta proteína no se ve un efecto considerable en la producción de partículas virales ni en la replicación del virus en un contexto de cultivo celular; sin embargo, en infecciones *in vivo* en ratones con virus mutados se observa una atenuación de la infectividad. Otra proteína similar a M2 es la proteína E de los CoV, que al eliminar los sitios de palmitoilación su gemación y replicación se ve disminuida. Un último ejemplo es la proteína 6K del virus Sindbis, que se encuentra penta-palmitoilada; la eliminación de estos sitios provoca la disminución de la formación de partículas virales y la generación de partículas aberrantes con nucleocápsides múltiples, sugiriendo que la palmitoilación de 6K está involucrada en la escisión de las partículas virales (Veit, 2012) (Boscarino, Logan, Lacny, & Gallagher, 2008) (Rossman et al., 2010).

### 1.3.5 Intercambio acil-biotina como método de detección de proteínas palmitoiladas

La identificación y detección de proteínas palmitoiladas ha supuesto un reto para los grupos de trabajo, una de las razones es que no existe una secuencia consenso para el sitio de palmitoilación que permita su predicción. Por otro lado, las dificultades que presentan las metodologías como el marcaje metabólico con el ácido palmítico radioactivo requieren de días de exposición para detectar una señal de palmitoilación debido a su baja sensibilidad (Li et al., 2022).



**Figura 5. Intercambio acil-biotina.** La detección de proteínas palmitoiladas por esta metodología permite identificar proteínas con una mayor sensibilidad y en menos tiempo. Consta de tres pasos: 1) bloqueo de grupos tiol. 2) escisión del grupo tiol palmitoilado y 3) unión a biotina para su detección. Recuperado de Sobocinska et al, 2018

Afortunadamente se han desarrollado técnicas que permiten una detección de proteínas palmitoiladas sin la necesidad de radioactividad como lo son: el método basado en química de clic (Li et al., 2022) y el intercambio acil-biotina (ABE), en el cual se profundiza a continuación.

La técnica ABE presenta ventajas considerables en comparación con el marcaje radioactivo, ya que reduce los tiempos de trabajo, confiere mayor seguridad, posee una mayor sensibilidad y la detección de las proteínas palmitoiladas es mayor. De manera general el ensayo consta de tres pasos (Figura 5), el primero requiere de un bloqueo irreversible con N-etilmaleimida (NEM) de todos los grupos tiol en los residuos de cisteínas que no se encuentren palmitoilados, como segundo paso una escisión específica con hidroxilamina (HAM) del grupo tiol de la cisteína palmitoilada, y finalmente como tercer paso el marcaje selectivo de la cisteína palmitoilada con un reactivo tiol conjugado a biotina para su posterior separación y detección con estreptavidina (Brigidi & Bamji, 2013).

## **2. JUSTIFICACION**

Los calicivirus codifican proteínas implicadas en el rearrreglo de membranas celulares internas para la formación de los complejos de replicación (CR), estructuras esenciales para llevar a cabo su ciclo replicativo. La palmitoilación es una de las modificaciones postraduccionales que favorece la localización de proteínas virales que carecen de secuencias de localización en organelos en las membranas internas. Estudios *in silico* realizados en nuestro laboratorio han sugerido la presencia de sitios de palmitoilación en diversas proteínas del FCV que se localizan en el RE y que no tienen dichas señales. El determinar si estas proteínas se palmitoilan contribuirá a comprender la biología del virus.

## **3. HIPOTESIS**

Las proteínas NS3 y LC del *Calicivirus felino* se palmitoilan durante el ciclo replicativo.

## **4. OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Determinar la palmitoilación de las proteínas NS3 y LC del FCV y su efecto durante la replicación.

### **ESPECÍFICOS**

1. Corroborar mediante análisis *in silico* los sitios putativos de palmitoilación para las proteínas NS3 y LC de FCV.
2. Evaluar el efecto del inhibidor de la palmitoilación 2-bromopalmitato (2-BP) en la expresión y localización subcelular de las proteínas NS3 y LC, así como en la producción de partículas virales.
3. Determinar si las proteínas virales NS3 y LC son susceptibles a palmitoilación durante la infección con FCV.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Análisis *in silico* de las proteínas NS3 y LC

Para realizar los análisis bioinformáticos, las secuencias de NS3 y LC de FCV cepa Urbana (URB) se obtuvieron de la base de datos del National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) con referencia NP\_783305.1 y NP\_783312.1, respectivamente. Los sitios de palmitoilación previamente identificados fueron corroborados con ayuda del software CSS-Palm 4.0 ([www.csspalm.biocuckoo.org](http://www.csspalm.biocuckoo.org)), para las predicciones de las hélices transmembrana se utilizaron los siguientes servidores on-line: TMSOC ([www.tmsoc.bii.a-star.edu.sg](http://www.tmsoc.bii.a-star.edu.sg)), CCTOP ([www.cctop.ttk.hu](http://www.cctop.ttk.hu)), TMHMM 2.0 ([www.services.healthtech.dtu.dk/service/tmhmm](http://www.services.healthtech.dtu.dk/service/tmhmm)) y MEMSAT-SVM ([www.bioinf.cs.ucla.ac.uk/psipred](http://www.bioinf.cs.ucla.ac.uk/psipred)). Los alineamientos de las secuencias de NS3 y LC con otros Vesivirus (Vesicular Exanthema of Swine Virus, Steller Sea Lion vesivirus, Hom-1 vesivirus, Walrus calicivirus, VESV-like calicivirus, Rabbit vesivirus y Reptile vesivirus Cro1) se realizaron con el software Jalview ([www.jalview.org](http://www.jalview.org)).

Las predicciones de las secuencias de localización nuclear (NLS) de NS3 FCV URB se realizaron con el servidor NLS mapper ([https://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](https://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)) con un valor de corte de 4, también se utilizó el servidor Wregex (<http://ehubio.ehu.eus/wregex/>) mediante la búsqueda del motivo TRG\_NLS\_Bipartite\_1 y TRG\_NLS\_MonoExtC\_3.

Para el modelado tridimensional de NS3, la secuencia se obtuvo de la base datos del NCBI con acceso NP\_783305.1 y se realizó la predicción de la estructura utilizando Alphafold 2.0 (<https://colab.research.google.com>).

### 5.2 Diseño de primers para NS3 FCV

Utilizando la secuencia completa del genoma del FCV con el número de acceso NCBI NC\_001481.2 se diseñaron los primers para la amplificación de la región comprendida de NS3 que se encuentra en la posición 1013-2074. Los primers diseñados se observan en la Tabla 1.

**Tabla 1. Secuencia de primers diseñados para NS3 FCV URB**

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>
NS3-FW	<b><u>CTCGAG</u></b> GATGTGGCAAACCTCA
NS3-RV	<b><u>TTCGAA</u></b> CTCCGCTTCAAATGC

Se diseñaron con las secuencias de las enzimas de restricción, en el caso del Forward (FW) se utilizó la enzima XhoI, y para el Reverse (RV) se utilizó la enzima BstBI, ambas marcadas en la Tabla 1.

### **5.3 Construcción y propagación del vector de tránsito**

La extracción del amplicón de NS3 FCV URB se realizó a partir de un gel de agarosa 1.5% en TBE 1X (Tris base 100mM, ácido bórico 100mM, EDTA 2mM) proveniente del plásmido pQ14, el cual contiene todo el genoma de FCV. Se utilizó el kit de extracción FastGene siguiendo el protocolo del fabricante y se determinó su concentración con NanoDrop. La reacción de ligación del amplicón de NS3 en el vector de tránsito pJet1.2 Blunt (Figura 6.) se realizó utilizando una relación de 3:1 y con las cantidades especificadas en la Tabla 2 y se dejó la reacción de ligación por 12 horas a 22° C.

**Tabla 2. Reacción de ligación al vector de tránsito pJet1.2 Blunt**

<b>Componente</b>	<b>Volumen (µL)</b>
<b>Buffer de reacción</b>	10
<b>pJet1.2 Blunt</b>	1
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	2.22
<b>Inserto DNA</b>	5.78 (54.34 ng)
<b>T4 ligasa</b>	1



del fragmento de NS3 del vector de tránsito pJet1.2 Blunt, utilizando las enzimas XhoI y BstbI como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3. Reacción de digestión del vector de tránsito pJet1.2 Blunt y NS3 FCV**

Componente	Reacción de doble digestión volumen ( $\mu\text{L}$ )	Reacción de digestión volumen ( $\mu\text{L}$ )
<b>Buffer universal 10X</b>	1	1
<b>BstbI</b>	1	1
<b>XhoI</b>	1	NA
<b>pDNA</b>	2	2
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	5	6

### 5.5 Cultivo celular

Las células Crandell Reese (CrFK) de riñón de gato se crecieron en placas p35, p60 o p100 (según sea el caso), a una confluencia de 90% en medio MEM (Minimum Essential Medium) suplementado al 7% de SFB (suero fetal bobino) e incubadas a 37° C y con una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. La integridad y confluencia de la monocapa se observaron y analizaron al microscopio óptico.

### 5.6 Infección viral con FCV

Las células CrFK se infectaron a una MOI (multiplicidad de infección) de 5 con FCV cepa Urbana en medio MEM libre de SFB, se incubaron a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora con agitación moderada cada 15 minutos, posteriormente se retiró el medio con ayuda de una trampa de vacío y las células se lavaron dos veces con PBS 1X estéril (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 1.8 mM). Se agregó medio MEM con 2% SFB (medio de mantenimiento) y se procesaron a diferentes hpi (horas post-infección) según sea el caso.

### 5.7 Ensayo de viabilidad celular con 2-BP

Se utilizó el ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular de las células después del tratamiento con diferentes concentraciones del inhibidor a las 5 hpi. Después se retiró el medio con el inhibidor y se cambió por 100  $\mu\text{L}$  de medio de mantenimiento nuevo (2% SFB)

y se agregó 10  $\mu$ L de MTT 12 mM por pozo. Se incubó por 4 horas a 37° C y se agregó 100  $\mu$ L de SDS-HCl 1 N y se incubó por 12 horas a 37° C. Finalmente se determinó la absorbancia a 540 nm en un lector de placas.

### **5.8 Tratamiento con el inhibidor 2-BP**

Las células CrFK se trataron con dos concentraciones de 2-BP (10 y 15  $\mu$ M, determinadas previamente por el ensayo de viabilidad celular) al inicio de la infección para evaluar el efecto en las proteínas virales por diferentes metodologías.

### **5.9 Extractos protéicos**

Una vez transcurrido el tiempo post-infección, las células CrFK se rasparon con ayuda de un raspador desechable estéril y se centrifugaron a 3000g por 5 minutos a 4° C para recuperar la pastilla celular, el pellet se resuspendió con buffer de lisis RIPA 1X (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, Tritón X-100 1%, SDS 10% 0.1%, deoxicolato de sodio 0.1%) con inhibidores de proteasas por 30 minutos en agitación a 4° C, para recuperar el lisado celular correspondiente a las proteínas totales, se centrifugó a 14000g por 20 minutos a 4° C para su posterior cuantificación y almacenamiento.

### **5.10 Inmunoprecipitación de proteínas virales**

Para la inmunoprecipitación de las proteínas virales NS3 y LC se utilizaron placas p60 con células CrFK al 90% de confluencia y se infectaron con FCV URB a una MOI de 5 y la infección se llevó a las 5 hpi, después se lisaron las células y se agregó 1.8 y 10  $\mu$ L de  $\alpha$ -LC y  $\alpha$ NS3, respectivamente y por separado. Se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente (TA) y se agregó 9  $\mu$ L de perlas de agarosa recubiertas de proteína A/G plus (Santa Cruz Biotechnology) se incubaron toda la noche a 4°C. Para recuperar las perlas se centrifugaron las muestras a 3000g por 5 minutos 4° C y se realizaron 3 lavados con PBS 1X y para recuperar las proteínas precipitadas las muestras se resuspendieron con 40  $\mu$ L de buffer Laemmli 2X (4% SDS, 20% glicerol, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.04% azul de bromofenol), e hirvieron por 10 minutos y finalmente se recuperó la proteína centrifugando 5 minutos a 1000g.

### **5.11 Intercambio acil-biotina (ABE)**

Se utilizaron células CrFK infectadas (MOI de 5) o simuladas de infección (MOCK) a una confluencia de 90% en placas p60. La lisis celular se realizó con buffer de lisis ABE (IGEPAL CA-630 1%, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, 10% glicerol) con NEM (N-ethylmaleimida) 2M. Las proteínas virales se inmunoprecipitaron de la forma descrita previamente. Las muestras se trataron o no (control negativo) con HAM (Hidroxilamina) 1 M por 1 hora a TA y se lavaron 3 veces con buffer de lisis ABE pH 7.2. Finalmente, se resuspendieron con 0.5 mL de buffer biotina-HPDP (biotina-HPDP 8 mM en 0.5 mL DMSO) 1.5 o 2  $\mu$ M, se incubó por 1 hora a 4°C y las perlas se lavaron 3 veces con buffer de lisis ABE pH 7.2 para finalmente resuspender con 40  $\mu$ L de buffer Laemmli 2X sin beta-mercaptoetanol (BME) y hervir por 10 minutos. La proteína se recupera por centrifugación y se almacena para su posterior análisis por Western Blot

### **5.12 Análisis por Western Blot**

Los extractos proteicos contenidos en buffer Laemmli 2X se incubaron a 80-90° C por 5 minutos y se cargaron en un gel de acrilamida-bisacrilamida al 15 y 10% para analizar detectar LC y NS3, respectivamente. Se corrieron a 50 V hasta alcanzar el gel separador y se aumentó a 100 V por 1.5 horas. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa con poro de 0,22  $\mu$ m a 85 V por 1.2 horas con buffer Dunn 1X 8% metanol (NaHCO<sub>3</sub> 10 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) y se bloqueó con PBS-Tween20 0.05% 1X (5 0mM Tris, 150 mM NaCl) y 5% de leche descremada por 30 minutos o 3% BSA (albúmina de suero bovino) para las muestras del ensayo ABE por 1 hora. La membrana se incubó con los anticuerpos primarios a la dilución correspondiente ( $\alpha$ -VP1 1:100000,  $\alpha$ -ANX A2 1:200000 y  $\alpha$ -LC 1:80000,  $\alpha$ -NS3 1:10000,  $\alpha$ -Actina 1:60000,  $\alpha$ -Lámina A/C 1:2000,  $\alpha$ -Smac 1:7000, Estreptavidina-HRP 1:12500). Finalmente, la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween20 0.05% y se incubó con el anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG ratón o conejo (1:20000 1:25000, respectivamente) por 2 horas a TA. Se reveló con el kit de quimioluminiscencia SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) en placas fotosensibles Carestream.

### **5.13 Evaluación de la producción de partículas virales por plaqueo**

Para evaluar la producción de partículas virales en presencia o no del inhibidor 2-BP se utilizaron células CrFK a una confluencia del 80-90%, se realizaron diluciones seriadas (de

$10^{-1}$ - $10^{12}$ ) con los sobrenadantes de los ensayos realizados con el inhibidor en medio MEM sin SFB por 1 hora con agitación moderada cada 15 minutos. Se retiró el medio y se lavó con PBS 1X, se agregó medio con carboximetilcelulosa estéril (2 g de carboximetilcelulosa en 100 mL de ddH<sub>2</sub>O) y se incubó por 48 horas sin movimiento a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado las 48 horas se retiró la carboximetilcelulosa y las células se lavan con PBS 1X, se agregó 400 µL de formaldehído (1:9 en PBS) y se incubó por 15 minutos antes de retirar, después se añade 350 µL de cristal violeta (0.1 g cristal violeta, 30 mL etanol, 70 mL ddH<sub>2</sub>O) por 20 minutos y finalmente se lavó con agua y se determinó las unidades formadoras de foco (UFF).

#### **5.14 Ensayos de Inmunofluorescencia**

Se utilizaron cubreobjetos de vidrio para sembrar y cultivar las células CrFK según corresponda la condición para cada experimento. Una vez transcurrido el tiempo post-infección, las células se fijan con formaldehído (1:9 PBS 1X filtrado) por 20 minutos, y se lavaron 2 veces con PBS 1X filtrado por 10 minutos, después de permeabilizaron con tritón X100 0.5% por 5 min a TA y se lavaron 2 veces más con PBS 1X filtrado por 10 min. Las muestras se bloquearon con gelatina de cerdo al 0,5 % en PBS 1X filtrado por 1 hora a TA, se lavaron y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente ( $\alpha$ -NS3 1:100,  $\alpha$ -LC 1:130 y  $\alpha$ -PDIA3 1:150) a 4 °C durante toda la noche. Se lavaron con PBS 1X filtrado por 10 minutos y se agregaron los anticuerpos secundarios ( $\alpha$ -IgG ratón conjugado a Alexa 488 y 1:220 y  $\alpha$ -IgG conejo conjugado a CY5 1:200) por durante 1 hora a TA, después las muestras incubaron con 100 µL de DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol, 1 mg/ml) por 5 minutos y se lavaron con PBS 1X filtrado. Las muestras se trataron con medio de montaje líquido Vecta-Shield (Vector Laboratories AC) y se analizarán con un microscopio confocal Zeiss LSM-700.

#### **5.15 Fraccionamiento núcleo-citoplasma**

Las células CrFK se sembraron en placas p100 con una confluencia del 80-90 % y se infectaron con FCV URB MOI 5 o de forma simulada (MOCK) por 5 horas en presencia del inhibidor 2-BP o del vehículo, y se lavaron con PBS. Las células se homogeneizaron en tampón hipotónico frío (HEPES 20 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10 %, Tritón X-100 al 0,5 % y un cóctel de inhibidores de proteasa), se incubaron a 4 °C por 10 minutos y se agitaron durante 1 minuto y después se centrifugaron a 2000g durante 1 minuto. El

sobrenadante se tomó como la fracción citoplasmática, y el sedimento nuclear se resuspendió en un tampón hipertónico (NaCl 240 mM, HEPES 20 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 20 %, Tritón X-100 al 1 % y un cóctel inhibidor de proteasa), se agitó durante 30 min a 4 °C, se centrifugó a 12000g por 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se tomó como la fracción nuclear para su posterior cuantificación y análisis por western blot.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Identificación *in silico* de los sitios de palmitoilación de NS3 y LC de FCV URB

Mediante estudios *in silico* desarrollados previamente en nuestro grupo de trabajo, se habían identificado sitios putativos de palmitoilación en las proteínas NS2, NS3, NS4, NS6/7 y LC del FCV. Debido a esto, corroboramos la existencia de dichos posibles sitios de palmitoilación en las proteínas NS3 y LC por ser proteínas con funciones semejantes a otras proteínas virales que ya habían sido reportadas como blancos de palmitoilación. Para esto las secuencias de aminoácidos de NS3 y LC se analizaron mediante el software CSS-Palm 4.0 y los resultados se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4. Sitios de palmitoilación identificados *in silico* para NS3 y LC**

PROTEÍNA	POSICIÓN	PÉPTIDO	SCORE
LC	2	*****MCSTCANVL	15.973
LC	5	***MCSTCANVLKYY	13.499
<b>LC</b>	<b>39</b>	<b>FCDNPLMCCYPELLP</b>	<b>10.034</b>
<b>LC</b>	<b>40</b>	<b>CDNPLMCCYPELLPE</b>	<b>9.004</b>
NS3	15	YMAAAILCYLITGLI	24.7
NS3	34	RLSKIKACLAGATTL	11.089
NS3	133	LDGVITSCNKRKAIA	5.302

Los resultados identificaron dos sitios nuevos de palmitoilación para LC, ubicados en las posiciones 39 y 40, respectivamente. Para NS3 se logró identificar un sitio nuevo de palmitoilación en la posición 15 de la secuencia. Con esto se corrobora que ambas proteínas son candidatos potenciales a ser palmitoilados.

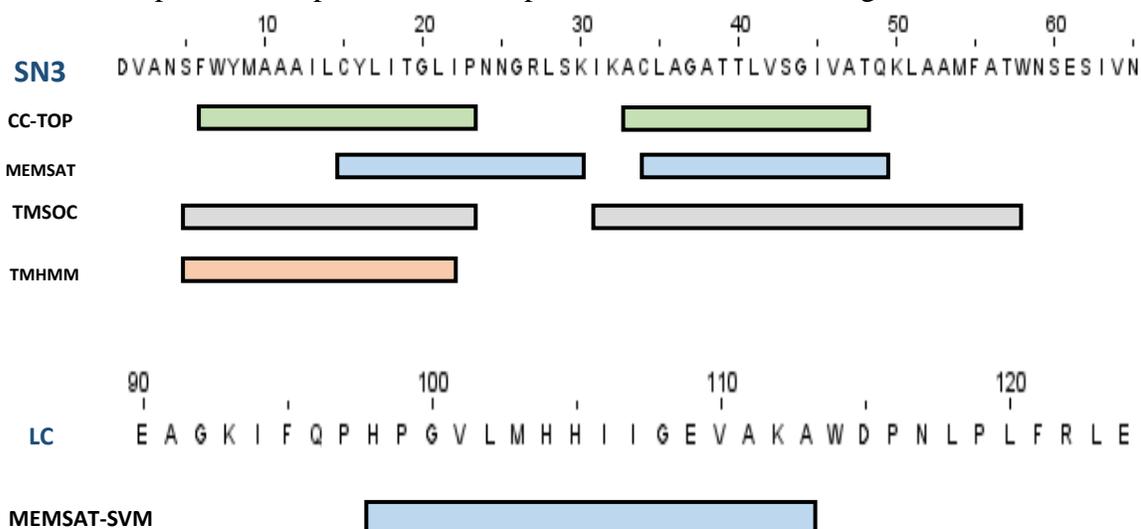
## 6.2 Predicción de hélices transmembranas (HTM) en NS3 y LC de FCV URB

La presencia de HTM en ambas proteínas fueron predichas utilizando cuatro diferentes servidores, esto para comparar que la posible HTM estuviera ubicada dentro de la misma región de la proteína y así validar los resultados. Los resultados obtenidos para ambas proteínas se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Identificación de HTM de las proteínas NS3 y LC**

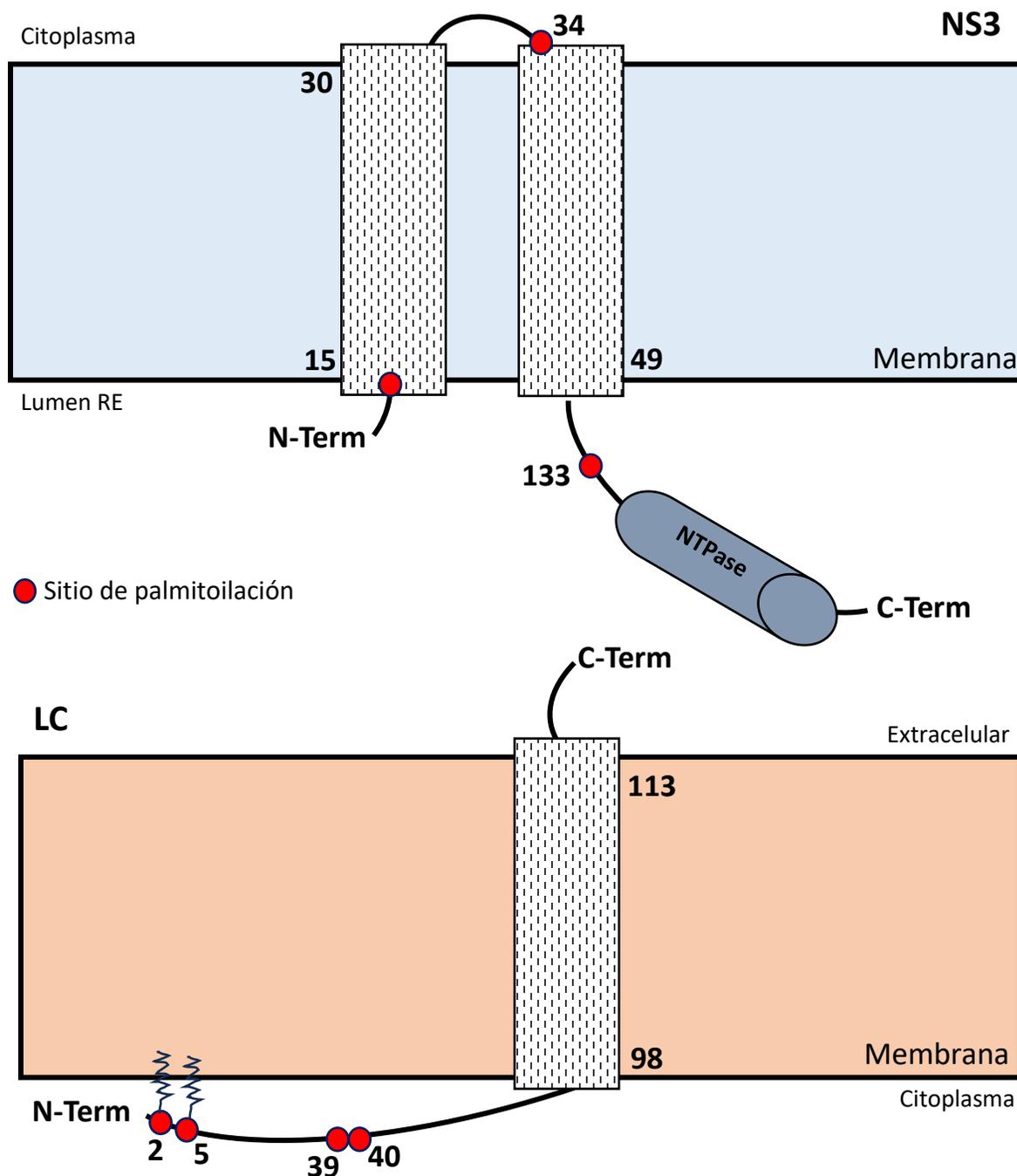
SERVIDOR	NS3		LC	
	HTM	LOCALIZACIÓN	HTM	LOCALIZACIÓN
CC-TOP	2	6-23	NA	NA
		33-48		
MEMSAT-SVM	2	15-30	1	98-113
		34-49		
TMSOC	2	5-23	NA	NA
		31-58		
TMHMM 2.0	1	5-22	NA	NA

Los resultados obtenidos, arrojan la localización de las posibles regiones de HTM dentro de las secuencias para las dos proteínas, como podemos observar en la Figura 7.



**Figura 7. HTM para NS3 y LC.** Se localizaron las regiones predichas como HTM dentro de las secuencias de las proteínas. Para el caso de NS3, tres de los cuatro servidores predicen dos HTM prácticamente en las mismas secuencias. En LC sólo se identificó una HTM. Verde CC-TOP, azul MEMSAT, gris TMSOC y naranja TMHMM.

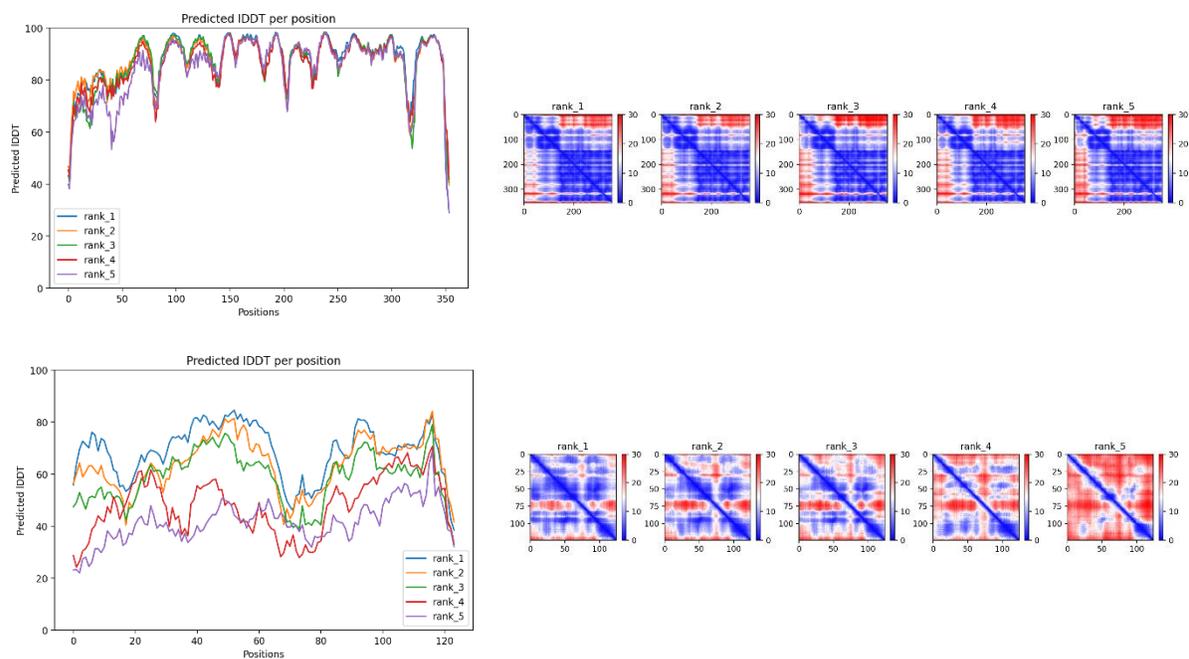
Posteriormente y con la información generada por los servidores de palmitoilación y HTM, se realizó la topología de dichas hélices insertadas en una membrana, para este modelado se tomó como referencia al servidor PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). A continuación, se muestran los resultados.



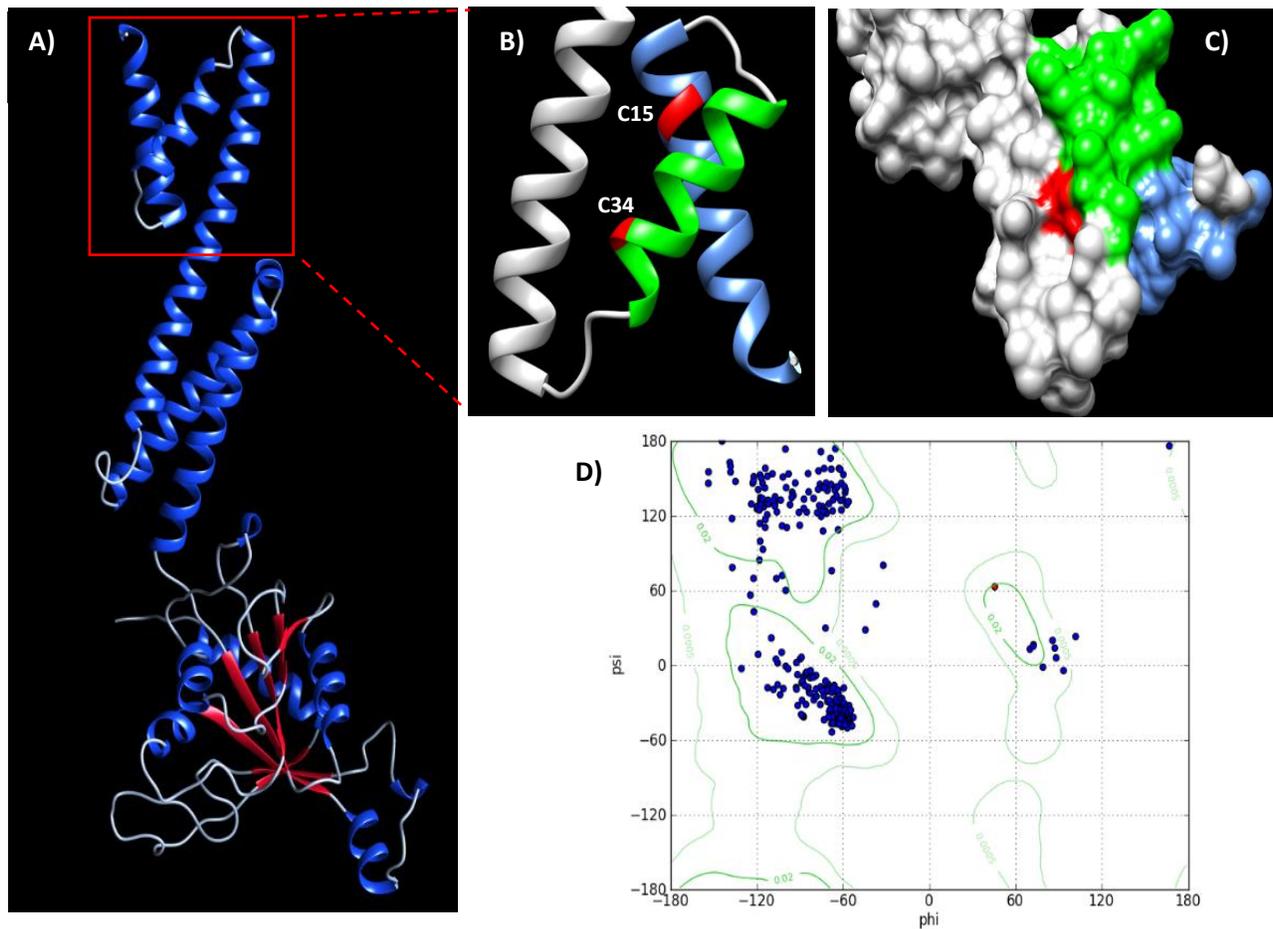
**Figura 8. Topología de las posibles HTM de NS3 y LC.** Se realizó el modelado de la inserción de las proteínas con la membrana del RE y plasmática para NS3 y LC, respectivamente. Se utilizó al servidor PSIPRED como referencia para el modelado.

### 6.3 Modelado tridimensional de las proteínas NS3 y LC del FCV

Para complementar el análisis in silico de las proteínas, se realizó la predicción de la estructura de NS3 y LC de FCV utilizando el servidor de Alphafold 2.0, los resultados muestran un valor de IDDT mayor del 95% para NS3, mientras que este valor fue en promedio de 75% para LC, el cual aún se considera como confiable (Figura 9). Una vez que se generaron las estructuras tridimensionales de las proteínas, estas se validaron con el gráfico de Ramachandran generado por el software Chimera 1.16 como se muestra en la Figura 10 y 11.

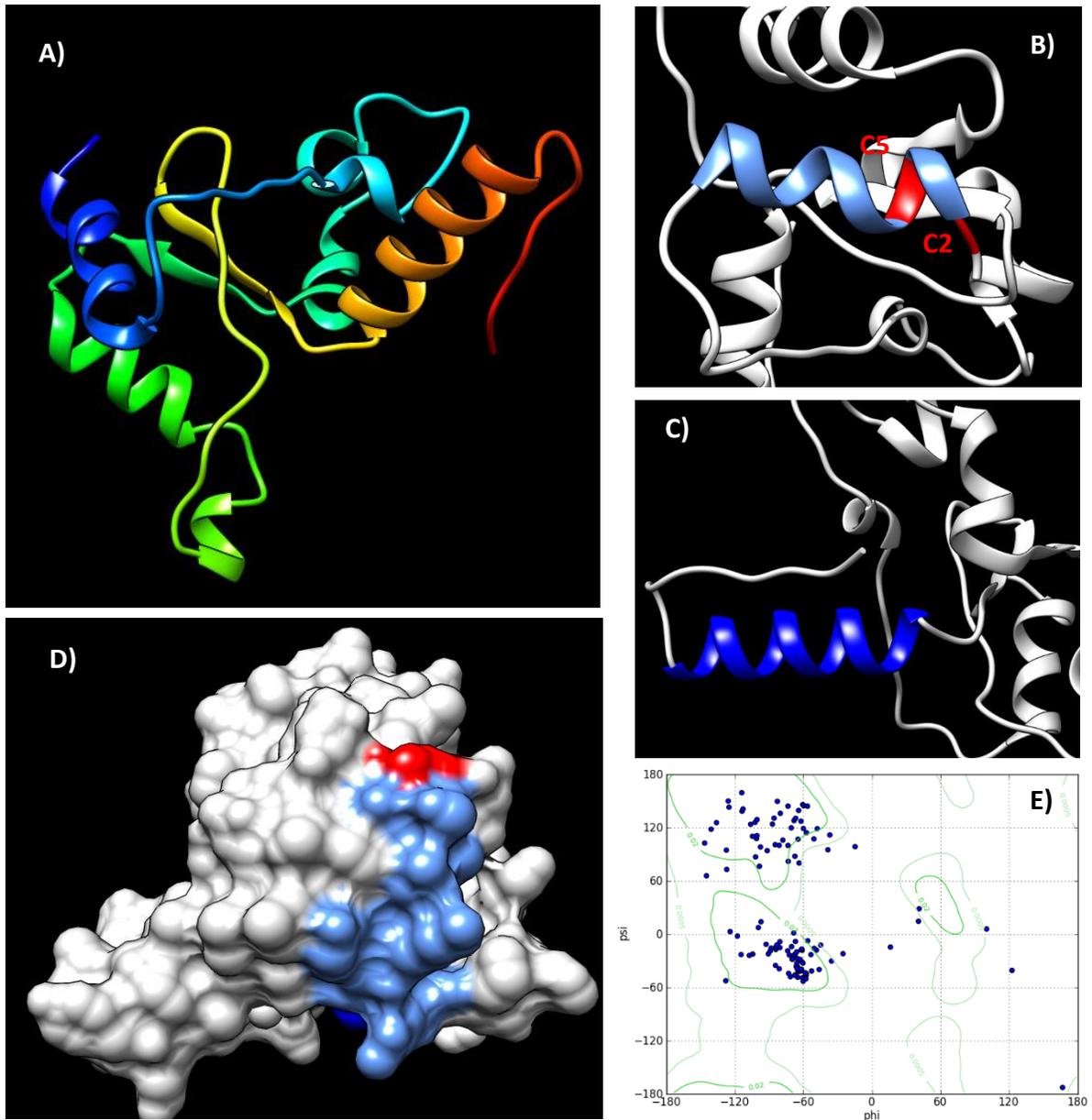


**Figura 9. Puntaje IDDT del modelado de NS3 y LC por Alphafold 2.0.** A) Gráfico IDDT para NS3, para los 5 modelos generados se obtiene un valor superior al 90% de confianza. B) Gráfico de IDDT para LC, el modelo 1 obtuvo un valor superior de confianza (75%) en comparación con los otros 4 modelos generados.



**Figura 10. Modelado tridimensional de NS3 de FCV generado por AlphaFold 2.0.** A) Estructura secundaria de NS3 de FCV URB. B) Ampliación del extremo N-terminal de NS3, se observa la HTM 1 (en azul) y la HTM 2 (en verde) ambas en su estructura secundaria, en rojo se muestran los sitios de palmitoilación predichos (C15 y C34). C) Extremo N-terminal de NS3 mostrando la superficie de la proteína, en rojo se observa que el sitio de palmitoilación en la C34 se encuentra expuesto, mientras que la C15 no lo está. D) Gráfico de Ramachandran que muestra los residuos de NS3 dentro de las zonas permitidas, validando la estructura de la proteína.

El modelo tridimensional de NS3 muestra las dos HTM que habían sido predichas por los servidores en el extremo N-terminal de la proteína, confirmando de forma indirecta que NS3 de FCV presenta estas estructuras. De igual forma, uno de los sitios de palmitoilación (C34) de NS3 se encuentra expuesto lo que permitiría su accesibilidad para ser palmitoilado. En la Figura 10 B), se observan ambos sitios de palmitoilación dentro de las HTM, lo que contradice la literatura, sin embargo, esto se puede explicar debido al modelado generado por AlphaFold, ya que como se observa en la Figura 9 A) los primeros 30 aminoácidos tienen una baja confiabilidad (<30%).



**Figura 11. Modelado tridimensional de LC de FCV generado por AlphaFold 2.0.** A) Estructura secundaria de LC de FCV URB. B) Ampliación del extremo N-terminal de NS3, se observa en azul una hélice (posición 3-12) que no había sido predicha por los servidores, en rojo se muestran los sitios de palmitoilación predichos (C2 y C5). C) Extremo N-terminal de LC, en azul se observa una hélice (posición 101-114), que coincide con la HTM predicha por el servidor MEMSAT-SVM. D) Superficie de LC, en azul se observa la hélice del extremo N-terminal y en rojo el sitio de palmitoilación predicho (C2) que se encuentra expuesto. E) Gráfico de Ramachandran que muestra los residuos de LC dentro de las zonas permitidas, validando la estructura de la proteína.

Como podemos observar en el modelo 3D de LC de FCV generado por AlphaFold, en el extremo N-terminal se encuentra una estructura de hélice que, no había sido predicha por los servidores de HTM (Figura 11 B). Por otro lado, se confirma la presencia de la HTM en el extremo C-terminal de la proteína (Figura 11 C) que previamente había sido predicha por el

servidor MEMAT-SVM (Tabla 5) en la región de 100-114 a.a. Al igual que NS3, LC únicamente presenta un sitio de palmitoilación expuesto en la superficie de la proteína que corresponde a la C2, permitiendo su accesibilidad para ser palmitoilada dentro de la célula.

#### 6.4 Conservación de los sitios de palmitoilación de NS3 de otros vesivirus

Para apuntalar la importancia de los sitios de palmitoilación dentro de ambas proteínas, se realizó un alineamiento de las secuencias de NS3 y LC de otros vesivirus con ayuda del servidor Clustal Omega y como se puede observar en la Figura 12, dos de los posibles sitios de palmitoilación (C15 y C133) de NS3 se encuentran conservados; sin embargo, estos no se encuentran expuestos en la superficie de la proteína como se muestra la Figura 10. Por otro lado, la C34 de NS3 (que también es candidata a palmitoilación y está expuesta en la superficie de la proteína) no se encuentra conservada y curiosamente es la única de todas las secuencias alienadas que presenta una C en dicha posición.

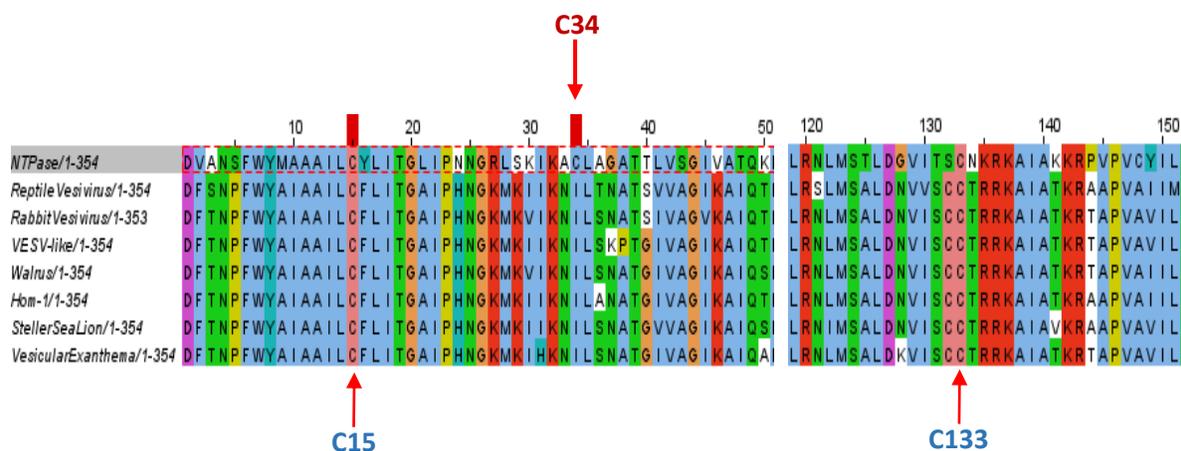


Figura 12. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de NS3 de diversos Vesivirus. El alineamiento se realizó con el servidor Clustal Omega.

También se realizó la predicción de los sitios de palmitoilación de NS3 con las secuencias de los vesivirus utilizados en el alineamiento anterior, se utilizó el software GPS-PALM para dicho estudio y los resultados se observan en la Tabla 6.

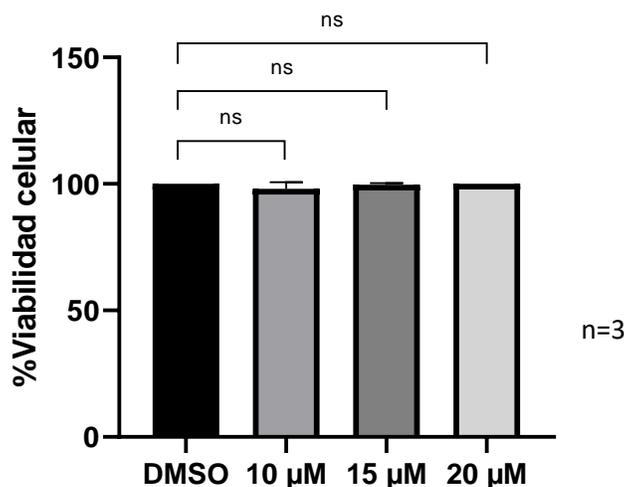
**Tabla 6. Predicción de palmitoilación de NS3 de diversos vesivirus**

VIRUS	POSICIÓN	SECUENCIA	SCORE
ReptileVesivirus Cro1	15	YAIAAILCFLITGAI	27.217
ReptileVesivirus Cro1	132	ALDNVVCCTRRKAI	9.418
ReptileVesivirus Cro1	133	LDNVVCCTRRKAIA	7.498
RabbitVesivirus	15	YAIAAILCFLITGAI	24.874
RabbitVesivirus	132	ALDNVISCCTRRKAI	8.314
RabbitVesivirus	133	LDNVISCCTRRKAIA	6.988
VESV-like calicivirus	15	YAIAAILCFLITGAI	24.874
VESV-like calicivirus	132	ALDNVISCCTRRKAI	8.314
VESV-like calicivirus	133	LDNVISCCTRRKAIA	6.988
Walrus calicivirus	15	YAIAAILCFLITGAI	24.874
Walrus calicivirus	132	ALDNVISCCTRRKAI	10.473
Walrus calicivirus	133	LDNVISCCTRRKAIA	6.898
Hom-1 vesivirus	15	YAIAAILCFLITGAI	24.874
Hom-1 vesivirus	132	ALDNVISCCTRRKAI	9.926
Hom-1 vesivirus	133	LDNVISCCTRRKAIA	6.898

Este alineamiento también se realizó con las secuencias de la proteína LC de varios vesivirus, sin embargo, debido a la dificultad que conlleva el estudio *in silico* de LC, no se pudo obtener un resultado satisfactorio, y en la predicción de los sitios de palmitoilación únicamente la proteína LC de FCV es candidata a palmitoilación (Tabla 4).

### 6.5 Viabilidad celular en presencia del inhibidor 2-BP

Una vez corroborado que las proteínas virales NS3 y LC podrían ser susceptibles a la palmitoilación, se quiso determinar como primera aproximación, el efecto del inhibidor de la palmitoilación 2-BP en la infección. Para ello era necesario asegurar que éste no afectara la viabilidad de las células y con ello la interpretación de los resultados. Se probaron tres diferentes concentraciones del inhibidor (10, 15 y 20  $\mu\text{M}$ ) y la viabilidad se determinó por el ensayo de MTT, los resultados se muestran en la Figura 13 y se puede observar que ninguna de las concentraciones probadas tiene un impacto negativo significativo en la viabilidad celular, por lo que se optó por utilizar las concentraciones de 10 y 15  $\mu\text{M}$  como las concentraciones de trabajo para los siguientes experimentos.

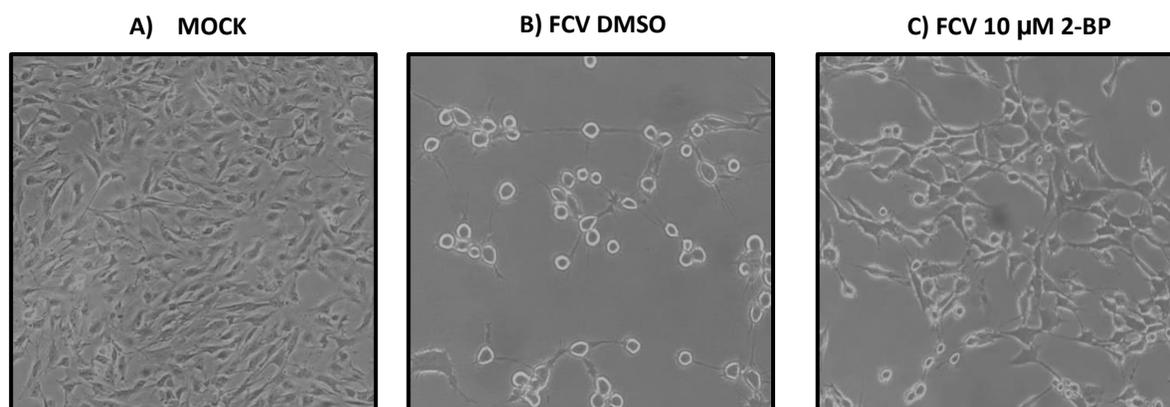


**Figura 13. Viabilidad celular en presencia de 2-BP.** Las células CrFK se trataron con 10, 15 y 20  $\mu\text{M}$  2-BP y el efecto en la viabilidad metabólica de células CrFK se determinó mediante ensayos de MTT. El análisis estadístico se realizó con las medias  $\pm$  SD de  $n=3$  experimentos independientes realizados por duplicado.

### 6.6 El efecto citopático producido por FCV disminuye en presencia de 2-BP

Uno de los primeros parámetros para determinar el efecto de 2-BP en la infección por FCV fue evaluar la posible reducción del efecto citopático producido por el virus. Para esto las células infectadas a una MOI de 5 fueron tratadas con una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de 2-BP al tiempo 0 post-infección y se llevaron hasta las 5 hpi donde se observó el efecto del fármaco en la monocapa de células CrFK (Figura 14).

El efecto citopático característico generado por la infección del FCV que consiste en el redondeamiento y refringencia celular, así como la disrupción de la monocapa (Figura 14 B). Sin embargo, en presencia de una concentración de 10  $\mu$ M de 2-BP a pesar de que la monocapa se disrumpe, se logra observar que las células conservan su morfología típica (alargadas, sin refringencia), sugiriendo un retraso en el efecto citopático producido por el virus (Figura 14 C). En el control de células sin infectar (MOCK) se observa una monocapa íntegra con células con una morfología epitelial (Figura 14 A).



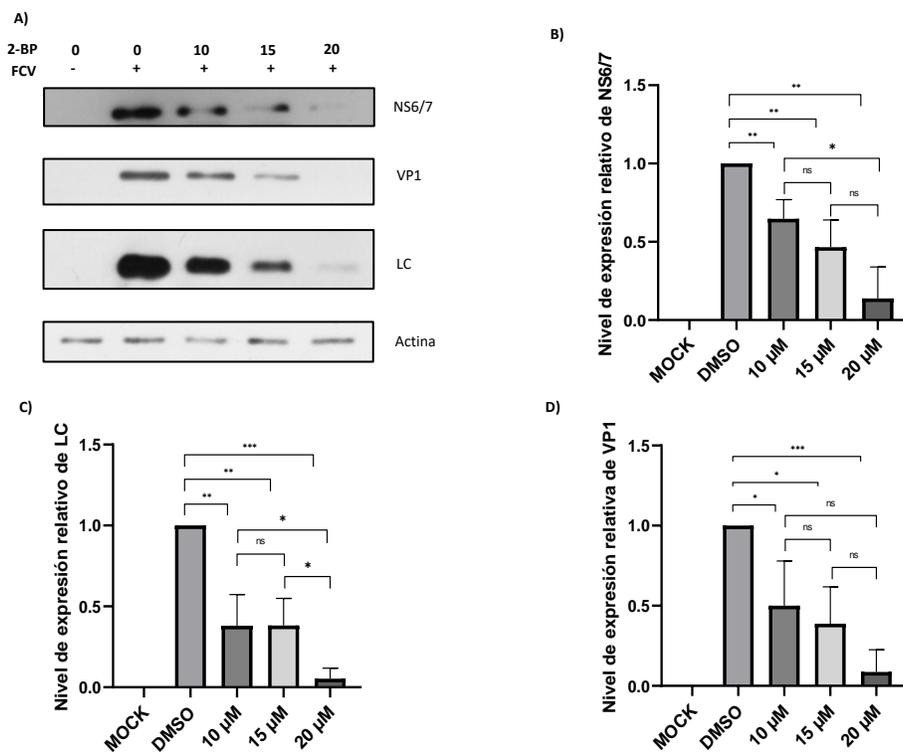
**Figura 14. El inhibidor 2-BP reduce el efecto citopático causado por FCV. El efecto citopático disminuye en las células infectadas. A) Monocapa de células CrFK sin infectar y sin el inhibidor. B) Células CrFK infectadas con FCV URB MOI 5 5 hpi. C) Células CrFK infectadas con FCV URB MOI 5 5 hpi con una concentración de 10  $\mu$ M del inhibidor.**

conserva parte de su morfología típica (células alargadas, sin refringencia, monocapa parcialmente íntegra) comparándola con el control de células sin infectar (MOCK). Por otro lado, las células infectadas con FCV que no fueron tratadas con el inhibidor presentan el efecto citopático característico (células redondeadas, refringencia, disrupción de la monocapa) de la infección.

### **6.7 Efecto del 2-BP en la síntesis de proteínas**

Debido a la disminución del efecto citopático producido por FCV en células tratadas con 2-BP, se analizó el efecto del inhibidor en la producción de las proteínas virales mediante western blot. Para ello, se infectaron células con FCV a MOI de 5 en presencia de concentraciones crecientes del fármaco (10, 15 y 20  $\mu$ M) y a 5 hpi se analizó la expresión de las proteínas tempranas (NS6/7) y tardías (VP1 y LC) (Figura 15).

La expresión de las proteínas tempranas y tardías del FCV disminuye en presencia del inhibidor 2-BP, como se puede observar en la Figura 15 A) esta disminución es dependiente de la concentración. Cuando se utilizó la concentración de 20  $\mu\text{M}$  de 2-BP la expresión de proteínas NS6/7, LC y VP1 disminuye significativamente un 90% Figura 15 B, 15 C y 15 D. Sin embargo, la concentración de 10  $\mu\text{M}$  disminuye la expresión de proteínas en un 50%, mientras que la concentración de 15  $\mu\text{M}$  la disminuye en un 70%. Estos resultados indican que la palmitoilación es un proceso importante durante la infección por FCV; sin embargo, debido a que este inhibidor afecta la palmitoilación de las proteínas celulares y virales, no podemos determinar, con estos experimentos, el mecanismo específico que ocasiona esta reducción en la disminución en la síntesis de proteína ni en el efecto citopático.

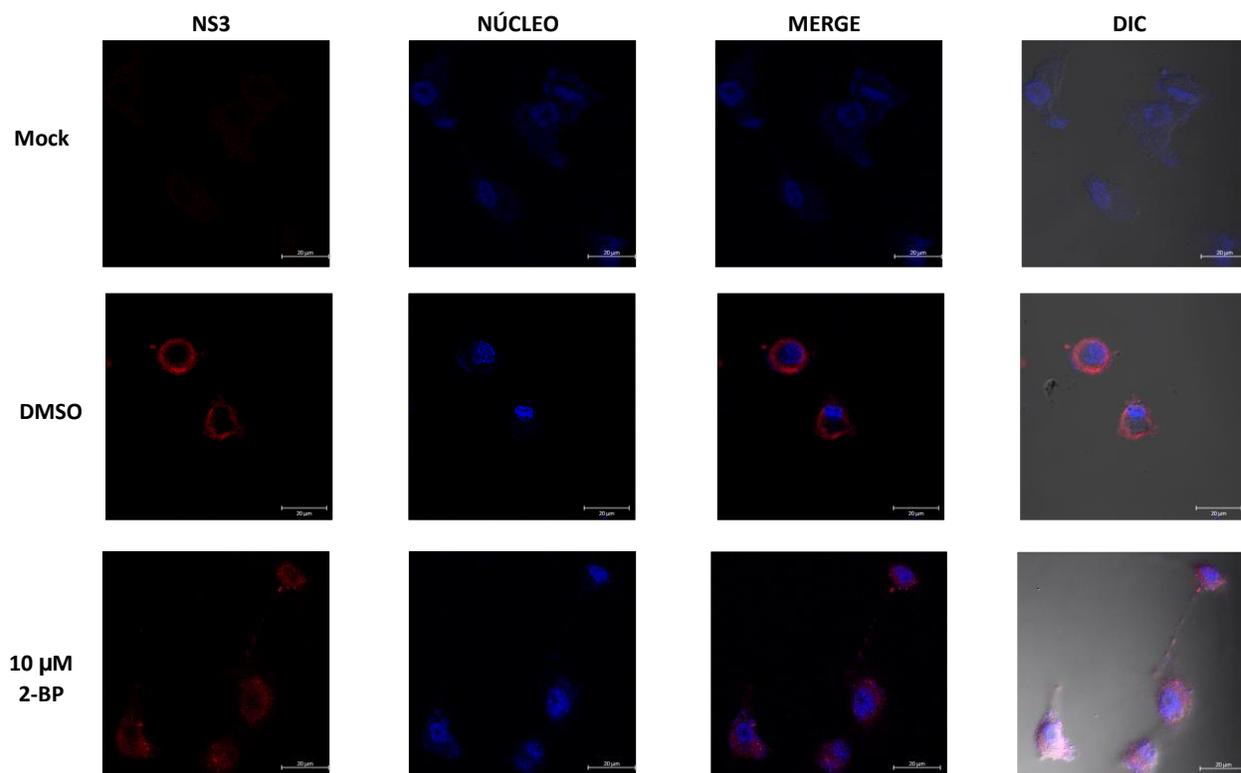


**Figura 15. Efecto del inhibidor 2-BP en la expresión de proteínas virales.** A) Análisis por western blot de la expresión de proteínas tempranas y tardías del FCV en presencia de 10, 15 y 20  $\mu\text{M}$  de 2-BP, se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. Normalización del nivel de expresión relativo de NS6/7 B), LC C) y VP1 D). El análisis estadístico de la densitometría se realizó con las medias  $\pm$  SD de  $n=3$  experimentos independientes realizados por triplicados. \* $p<0.05$ ,

## 6.8 Localización subcelular de NS3 con el inhibidor 2-BP

Una vez que se corroboró la reducción en la expresión de proteínas virales en presencia del inhibidor, se decidió analizar la localización subcelular de NS3 en células CrFK infectadas con el FCV mediante inmunofluorescencia (IF) (Figura 16).

La localización de NS3 durante la infección por FCV a 5 hpi en presencia únicamente del vehículo DMSO es citoplasmática (y posiblemente en el RE, según los reportes previos) y en la periferia de las células. Sin embargo, cuando las células infectadas son tratadas con una concentración de 10  $\mu$ M del inhibidor de la palmitoilación, se puede observar que las células mantienen parcialmente su morfología epitelial clásica y que se reduce la expresión de NS3, en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de western blot (Figura 15 A). Sin embargo, la proteína NS3 que se puede detectar, cambia su localización subcelular, y se puede observar tanto en el citoplasma como en el núcleo (Figura 16) lo que llamó fuertemente nuestra atención debido a la falta de reportes de la presencia de proteínas del FCV en el núcleo durante la infección en células CrFK.



**Figura 16. Localización subcelular de NS3 en células infectadas en presencia del inhibidor 2-BP.** Las células CrFK se infectaron con FCV URB MOI 5 por 5 horas en ausencia del fármaco (únicamente vehículo DMSO) o en presencia del fármaco a 10  $\mu$ M. Se utilizó anticuerpo  $\alpha$ -NS3, como anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG conejo acoplado a CY5 y los núcleos se tiñeron con DAPI.

No se realizó la IF de las demás concentraciones del inhibidor debido a la reducción en los niveles de proteína viral detectada en western blot.

### 6.9 Relocalización nuclear de NS3

Debido a las observaciones anteriores sobre la relocalización de NS3 del citoplasma hacía el núcleo en células infectadas con FCV cuando se inhibe la palmitoilación, se evaluó mediante análisis bioinformáticos la presencia de señales de localización nuclear (NLS) en la secuencia de NS3 para conocer el posible mecanismo por el cual está podría irse a núcleo. Para este análisis se utilizaron los servidores web cNLS Mapper y Wregex (Tabla 7).

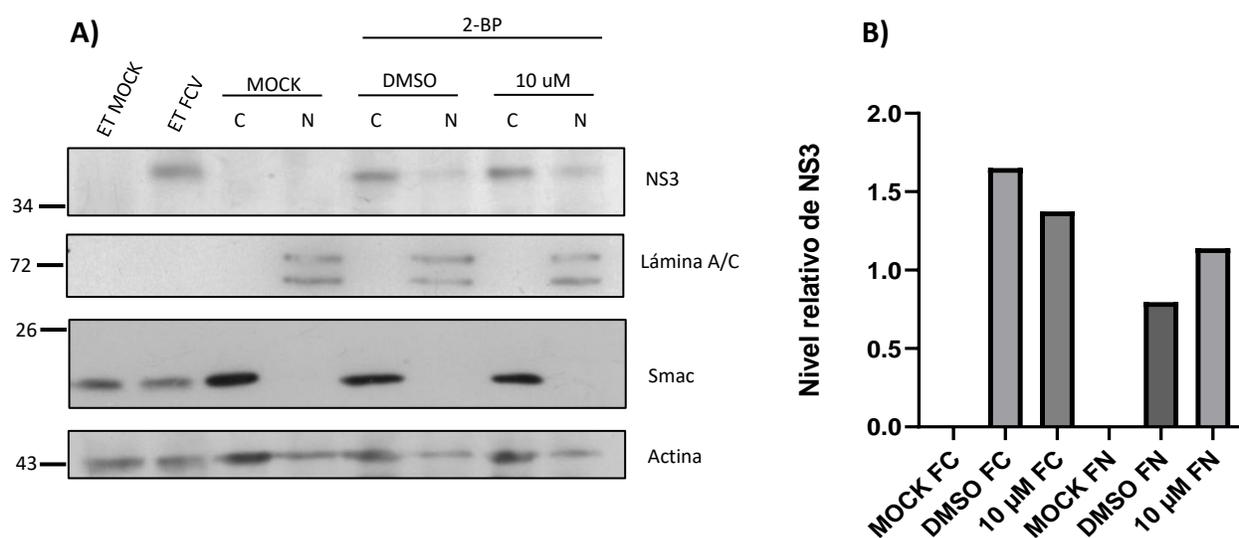
**Tabla 7. NLS predichas para NS3 de FCV**

Servidor	NLS	Secuencia	Score
cNLS Mapper	Bipartita	134 NKRKAIAKKRPVPCYILTGPPGCGKTTAALALAKK	4.1
cNLS Mapper	Bipartita	274 ESHKRARPGTSPVPRSCYKKNFSLSLAKRG	4
cNLS Mapper	Bipartita	299 LAKRGAECWCKEYVLDPKGLQHQSIAKAPP	4.7
Wregex	Bipartita	261 RRVTIIDVANPLAESHKRARP	
Wregex	Monopartita	276 HKRARP	

El servidor cNLS Mapper realizó la predicción de tres posibles NLS bipartitas en la secuencia de NS3, todos ellos en el extremo C-terminal de la proteína utilizando un valor de corte de 4. Por otro lado, Wregex predijo dos posibles NLS, una bipartita y otra monopartita. La NLS bipartita y monopartita predicha por Wregex (KRARP) está dentro de la NLS predicha por cNLS Mapper (posición 274), sugiriendo que se puede considerar como una sola NLS predicha por dos servidores distintos.

Para identificar la presencia de NS3 en el núcleo de células infectadas con FCV a 5 hpi, y tratadas con 2-BP, se realizó un fraccionamiento núcleo-citoplasma. Las fracciones citoplásmicas y nucleares se analizaron por western blot (Figura 17) y como controles de pureza del fraccionamiento se utilizó a la proteína Smac y Lámina A/C para las fracciones citoplásmica y nucleares, respectivamente.

Se puede observar la presencia de NS3 en los ET de células infectadas, pero no en los ET de células sin infectar, como era de esperarse. También, se detecta la presencia de la proteína NS3 en la fracción citoplásmica de células infectadas tratadas únicamente con el vehículo DMSO, y en menor cantidad en la fracción citoplásmica de las células infectadas y tratadas con 10  $\mu$ M de 2-BP. Por otro lado, en las fracciones nucleares se detecta una muy baja proporción de NS3, como resultado de la proteína presente en el RE y que posiblemente se asocia con las membranas nucleares. La cantidad de NS3 en el núcleo aumenta en las condiciones de infección en presencia de 2-BP (Figura 17 B). Ambos resultados en concordancia con los resultados anteriores de las Figura 15 y 16.



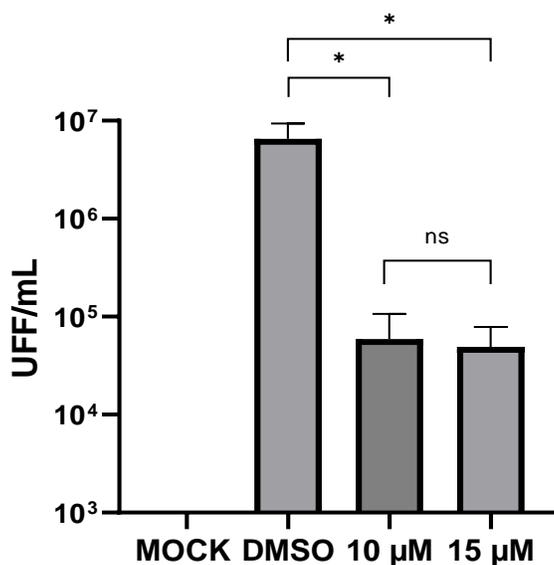
**Figura 17. Identificación de la proteína NS3 en fracciones nucleares y citoplásmicas de células infectadas y tratadas con 2-BP.** A) Células CrFK infectadas con FCV URB MOI 5 por 5 horas y tratadas con 2-BP o vehículo se fraccionaron en citoplasma (C) y núcleo (N). Los dos primeros carriles corresponden a extractos totales (ET) de células infectadas o simuladas. Se utilizó como control de pureza a la proteína Smac y Lámina A/C para las fracciones del citoplasma y núcleo, respectivamente. B) Análisis estadístico de la expresión relativa de NS3 en cada una de las fracciones con respecto a actina, realizado con el software ImageJ.

### 6.10 Efecto del inhibidor 2-BP en la producción de partículas virales

Debido a que la palmitoilación es importante para la síntesis de las proteínas virales, se determinó si se afectaba también la producción de partículas virales en presencia del inhibidor de la palmitoilación. Para esto se determinó la presencia de partículas virales en los sobrenadante de células CrFK infectadas con FCV URB a MOI de 5 y tratadas con

concentraciones diferentes de 2-BP (10, 15 y 20  $\mu\text{M}$ ) mediante ensayos de plaqueo (Figura 18).

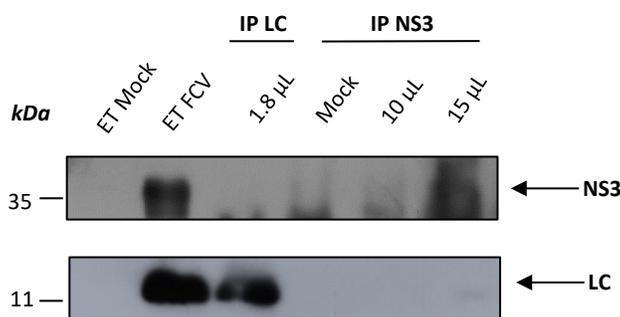
Cuando las células infectadas con FCV son tratadas con 10 y 15  $\mu\text{M}$  del inhibidor 2-BP se observa una disminución en la cantidad de partículas virales producidas, el cual fue estadísticamente significativo y de casi 2 logs. Esta disminución correlaciona con la disminución en la síntesis de proteínas observada en la figura 15, ya que, al haber una menor cantidad de estas, la morfogénesis del virus se ve afectada directamente. La concentración de 20  $\mu\text{M}$  de 2-BP no se analizó debido a que el efecto no nos permite la detección de partículas virales. De igual forma, existe una disminución en la cantidad de partículas virales producidas en los ensayos con 10 y 15  $\mu\text{M}$  de 2-BP, aunque al compararlas entre ellas, la diferencia no resulto significativa. Es posible que la palmitoilación afecte la morfogénesis viral posiblemente debido a la reducción en la producción de partículas virales necesarias para el ensamblaje de los viriones.



**Figura 18. La producción de partículas virales se reduce en presencia del inhibidor 2-BP.** Análisis estadístico de la producción de partículas virales de células infectadas con FCV URB MOI de 5 sin tratar o tratadas con 10 y 15  $\mu\text{M}$  de 2-BP. El gráfico muestra las medias  $\pm$  SD de n=3 experimentos independientes realizados por triplicados. \*p<0.05

### 6.11 Inmunoprecipitación de NS3

Como parte de la metodología del intercambio acil-biotina (ABE) se requería tener las condiciones de inmunoprecipitación (IP) estandarizadas, ya que es uno de los pasos principales para la detección de proteínas palmitoiladas durante la infección. En la Figura 19 se muestran los resultados de la estandarización de la IP de NS3.



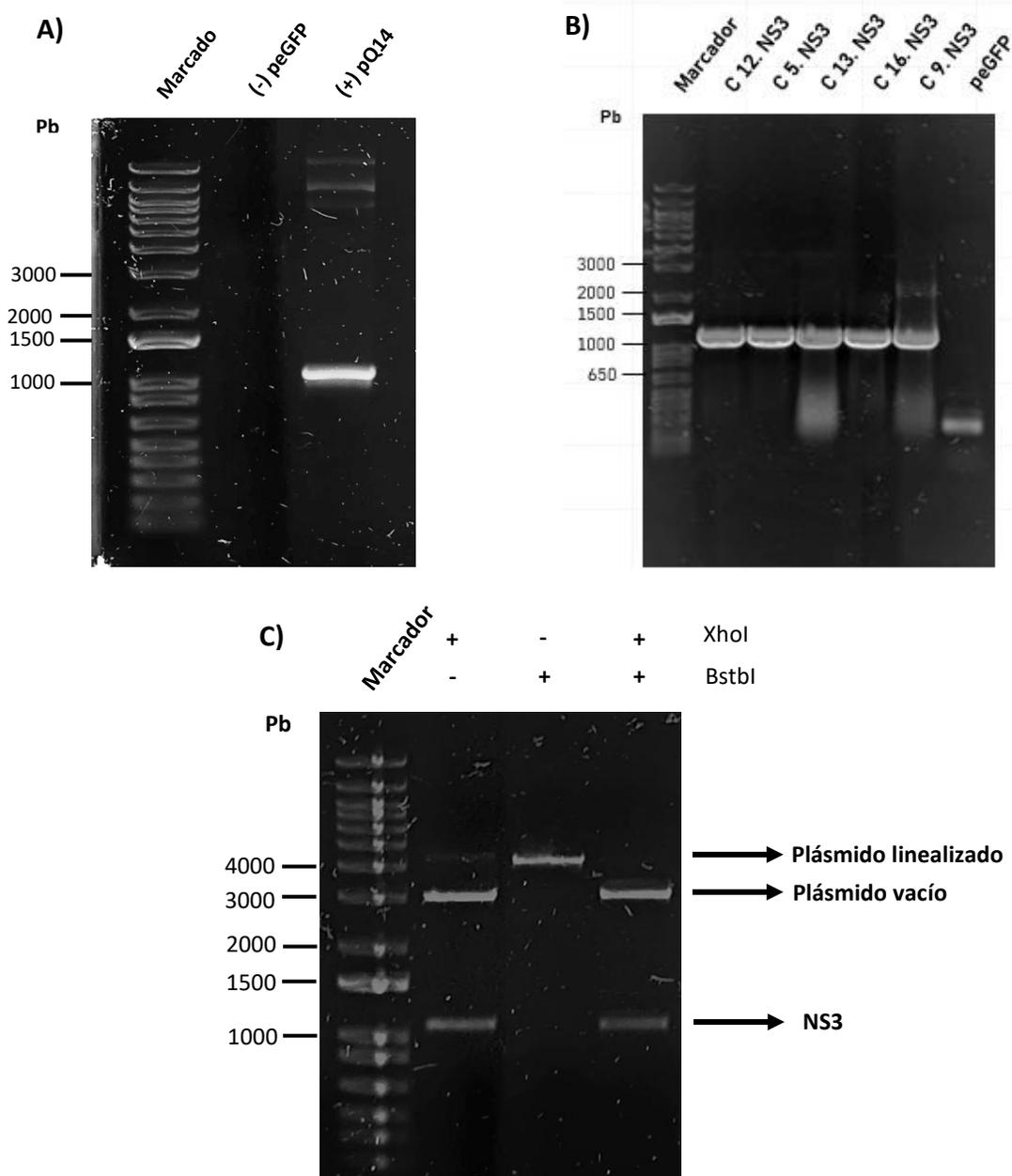
**Figura 19. Inmunoprecipitación de NS3.** Extractos de células CrFK infectadas o no con el FCV se utilizaron para estandarizar las condiciones de IP de NS3 y se analizaron por western blot. El panel inferior muestra la IP de LC como control de la metodología.

Para la IP de NS3, se probaron dos cantidades de suero  $\alpha$ -NS3 (10 y 15  $\mu$ L) y la cantidad de perlas de agarosa recubiertas con proteína AG-Plus se mantuvo constante y fue de 9  $\mu$ L. Únicamente en el carril que contine las muestras de la IP con 15  $\mu$ L de  $\alpha$ -NS3 es posible apreciar una ligera banda de reconocimiento (señalada por la flecha en la Figura 19) que parece migrar a la misma distancia que la señal en los extractos totales de células infectadas con FCV. Sin embargo, no la consideramos una señal evidente de NS3 debido a que la reproducibilidad no fue la esperada.

Debido a la baja especificidad del anticuerpo  $\alpha$ -NS3 para ensayos de IP, se optó por producir nuevos anticuerpos  $\alpha$ -NS3 en una especie distinta (ratón). Para ello se requiere de contar con la NS3 recombinante, para lo cual se requiere de la amplificación y clonación de la secuencia completa del gen de NS3 en los vectores de tránsito y expresión. El avance de estos y los resultados se muestran a continuación.

## 6.12 Clonación de NS3 en el vector de tránsito

Para expresar a la proteína NS3 era necesario tener la secuencia del gen en el vector de tránsito para su posterior sub-clonación al vector de expresión procarionte. Para evaluar la especificidad de los primers diseñados (Tabla 1) se realizó la amplificación de NS3 del plásmido pQ14, el cual contiene toda la secuencia del cDNA del genoma del FCV (Figura 20 A).



**Figura 20. Clonación de NS3 en el vector pJet1.2/Blunt.** A) Amplificación de NS3 del vector pQ14 con la secuencia completa del FCV. B) PCR a las colonias positivas crecidas en placas con medio LB y agar y amplificadas con los primers para pJet1.2/Blunt. C) Reacción de doble digestión de la C5 para la liberación del fragmento de NS3 y linealización del vector.

Utilizando los primers para la amplificación del gen de NS3, se obtuvo un producto de PCR con un tamaño de 1074 pb, el cual coincide con el tamaño esperado flanqueado con la secuencia de corte de las enzimas de restricción XhoI y BstbI. El segundo carril (Figura 20 A) contiene un vector no relacionado como control negativo, y no se generó ningún producto de PCR como era de esperar.

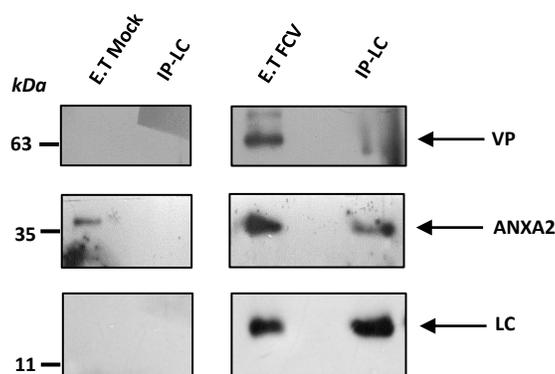
Continuando con la clonación, se purificó el amplicón obtenido por PCR del gen de NS3, y se ligó con el vector de tránsito pJet1.2/Blunt para posteriormente transformar bacterias y evaluar la presencia de la construcción de NS3-pJet1.2/Blunt (Figura 20 B). Se utilizaron los primers proporcionados por el fabricante para asegurar que la amplificación sea del vector con la secuencia de NS3. Las 5 colonias seleccionadas fueron positivas a la construcción y de estas se seleccionaron la C5, 12 y 16 para la purificación del pDNA.

Una vez realizada la extracción, el pDNA se cuantificó y se realizaron las reacciones de digestión para asegurar que el vector contenía la secuencia de NS3. Esta reacción de digestión se realizó únicamente con la C5 debido a que se estaban estandarizando las condiciones para la enzima BstbI (Figura 20 C). Se puede observar que cuando se realiza la digestión únicamente con la BstbI el plásmido se linealiza y únicamente se obtiene un producto que corresponde al tamaño completo del vector más la secuencia de NS3 (aproximadamente 4000 pb). En la doble digestión se obtienen dos productos, uno con el tamaño de NS3 (1074 pb) y otro que corresponde al tamaño del vector vacío (aproximadamente 3000 pb) indicando que la ligación y transformación se realizó de manera correcta. Al realizar la digestión con la enzima XhoI se obtiene la liberación del fragmento de NS3, esto se puede explicar debido a que en el vector pJet1.2/Blunt existe un sitio de corte previo para XhoI (Figura 6) y el sentido de la inserción generó que ambos sitios de corte estuvieran separados por la secuencia completa de NS3, generando la liberación del fragmento. Aún está pendiente realizar la ligación del inserto liberado con el vector de expresión procarionte adecuado.

Se continuarán con estos ensayos para poder expresar a la proteína NS3 recombinante y obtener anticuerpos para inmunoprecipitarla y realizar los ensayos de palmitoilación *in vitro*.

### 6.13 Inmunoprecipitación de la proteína LC

Para la estandarización de la IP de LC, los extractos totales de células CrFK infectadas con FCV MOI de 5 a 5 hpi se inmunoprecipitaron con 1.8  $\mu$ L de  $\alpha$ -LC de ratón producido en el laboratorio y para la separación se los anticuerpos se utilizaron 9  $\mu$ L de perlas de agarosa recubiertas proteína A/G plus (Figura 21).



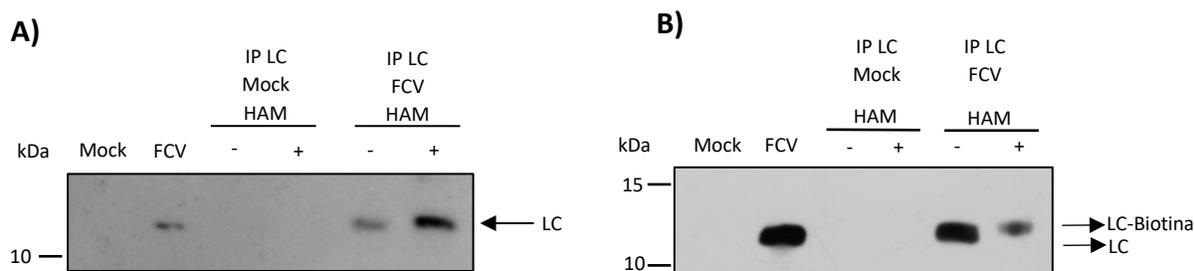
**Figura 21. Inmunoprecipitación de la proteína LC.** Extractos de células CrFK infectadas o no con el FCV se utilizaron para estandarizar las condiciones de IP de LC y la presencia de la proteína precipitada se analizó por western blot.

Debido a que la interacción entre anexina A2 (ANXA2) y LC ya había sido reportada, esta se utilizó como control de co-inmunoprecipitación (positivo). Como control negativo se utilizó a la proteína viral VP1, debido a que esta no interacciona con LC después de su procesamiento. Se puede observar que con las condiciones de IP mencionadas anteriormente se logró IP a la proteína LC y detectar mediante western blot, identificando la interacción entre LC-ANXA2 y validando el resultado obtenido.

### 6.14 Detección de la palmitoilación de LC

Una vez que las condiciones de IP de LC estaban establecidas, lo siguiente que se realizó fue la detección de la palmitoilación de LC mediante la técnica de ABE de extractos de células infectadas o con FCV a 5 hpi. El reactivo utilizado para biotinilar a LC fue Biotina-HPDP, que está reportado que este reactivo añade 0.4 kDa a las proteínas que se biotinilan y con esta información primero se realizó un western blot para identificar este aumento en la masa de LC (Figura 22 A). Las muestras del ABE analizaron por SDS-PAGE, en un gel convencional de glicina al 15% y se revelaron con  $\alpha$ -LC. Se observa una banda de reconocimiento en los extractos totales de células CrFK infectadas con FCV como era de esperarse y también en

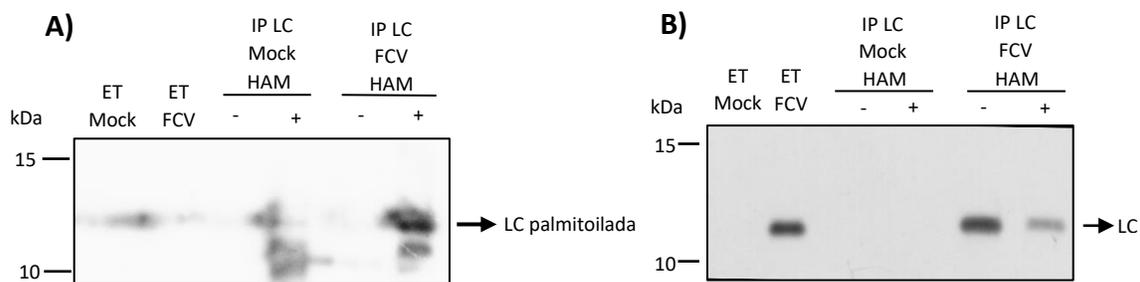
los lisados de células infectadas en los que se inmunoprecipitó a LC con los anticuerpos  $\alpha$ -LC. Al no observar la diferencia en la migración entre la LC proveniente de muestras ABE +HAM y -HAM, en geles convencionales, decidimos analizarlas los ensayos de SDS-PAGE en geles de tricina (Figura 22 B) los cuales permiten observar pequeñas variaciones de peso reflejadas en la migración de las proteínas. En estas condiciones sí se observó la diferencia en la migración entre las muestras biotiniladas o no (+HAM, -HAM), evidenciando que LC se encontraba biotinilada y por consecuencia estaba palmitoilada.



**Figura 22. La biotinilación de LC modifica la migración electroforética.** A) Muestras ABE de LC biotiniladas analizadas en un gel de glicina al 15%. B) Muestras ABE de LC analizadas en gel de tricina al 17%. En ambos casos se revelaron con  $\alpha$ -LC.

La manera de comprobar la palmitoilación de proteínas mediante ABE, es por medio de western blot utilizando estreptavidina-HRP para detectar a LC biotinilada, debido a la especificidad de unión que existe entre la biotina y la estreptavidina.

Las muestras ABE LC se analizaron en un gel convencional de glicina al 15% y se utilizó estreptavidina-HRP identificar la proteína palmitoilada (Figura 23 A).



**Figura 23. Detección de la palmitoilación de LC mediante ABE.** A) Muestras ABE de LC en gel de glicina al 15% y reveladas con estreptavidina-HRP. B) Muestras ABE de LC en gel de glicina al 15%, se utilizó  $\alpha$ -LC para relevar la membrana.

Cuando la membrana es revelada utilizando estreptavidina-HRP (Figura 23 A) se aprecia una única señal en las muestras ABE LC +HAM, la cual migra aproximadamente a 13-14 kDa (masa experimental de LC) indicando que la proteína LC está biotinilada, lo que de forma indirecta indica la palmitoilación de la proteína LC. Para las muestras ABE LC -HAM no se esperaba ninguna señal de reconocimiento debido a la falta de biotina en la proteína. Para asegurar que la señal observada en las muestras ABE LC +HAM corresponde a LC, una alícuota de las muestras se analizaron (Figura 23 B) en un gel convencional al 15% y se revelaron con  $\alpha$ -LC. Se puede observar señal de LC de las muestras ABE LC +/- HAM y ambas migran como la señal de los ET de células infectadas, indicando que la señal obtenida en la muestra HAM LC +HAM (Figura 23 A) corresponde a LC palmitoilada, confirmando la palmitoilación de LC.

## 7. DISCUSIÓN

El FCV pertenece al género *Vesivirus* y posee un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva (ssRNA+) y como otros virus pequeños de RNA (como picornavirus o flavivirus) tiene la capacidad de inducir una proliferación de membranas y un rearrreglo de las mismas para llevar a cabo la replicación de su genoma en estructuras membranosas provenientes del RE denominadas CR (Schaad, Jensen, & Carrington, 1997).

En estos CR aislados de células infectadas con FCV se han identificado proteínas virales estructurales y no estructurales (NS) (Green, Aaron, et al., 2002). Entre las proteínas NS identificadas en los CR, llama la atención la presencia de NS2, NS3 y NS4 debido a que se localizan en las membranas de RE colocalizando con marcadores como PDI o calnexina. De igual forma cuando estas proteínas virales se expresan de manera individual mantienen la localización y efecto sobre el RE, similar a lo que ocurre durante la infección con FCV (Bailey, Kaiser, et al., 2010). Lo anterior sumado al reporte de interacción entre estas proteínas en CR enzimáticamente activas (Kaiser et al., 2006), sugieren fuertemente que cumplen un papel esencial en la formación y función de los CR en células infectadas.

Si bien estas tres proteínas NS se localizan en las membranas del RE, aún no se ha identificado el mecanismo por el cual llegan y se insertan en dichas membranas, debido a

que en su estructura no poseen señales de localización ni transporte en la red RE-Golgi, dejando abierta la posibilidad de que sea mediante modificaciones postraduccionales, específicamente mediante la palmitoilación.

Las proteínas palmitoiladas adquieren características que modifican su localización, estabilidad, estructura y aumenta la interacción con membranas celulares (Sobocinska et al., 2018) y debido a que los virus secuestran la maquinaria celular es posible que las proteínas del FCV puedan ser blanco de palmitoilación para cumplir con su función de manera eficiente.

Si bien hasta la fecha no existen reportes de proteínas virales de la familia *Caliciviridae* que se palmitoilen, sí se tienen reportes sobre proteínas de virus pequeños de RNA que son susceptibles a esta modificación y comparten algunas características con proteínas del FCV, reforzando la hipótesis inicial sobre la palmitoilación de proteínas del FCV. Otra proteína con potencial de ser palmitoilada es la viroporina LC, debido a que esta modificación en viroporinas de otros virus facilitan una función adecuada dentro del ciclo de replicación del virus (Schaad et al., 1997).

Un primer análisis sobre palmitoilación *in silico* de las proteínas del FCV se generó en nuestro laboratorio, mostrando que cinco (NS2, NS3, NS4, NS6/7 y LC) de las nueve proteínas tienen sitios putativos de palmitoilación (Datos no reportados). En este trabajo corroboramos y ampliamos, mediante nuevos predictores bioinformáticos, los sitios putativos de palmitoilación en las proteínas NS3 y LC, el efecto que genera en la replicación del virus la inhibición de la palmitoilación con el 2-BP y la confirmación de la palmitoilación en LC.

Debido a que el uso de predictores bioinformáticos está siendo usado frecuentemente como un primer acercamiento hacia posibles blancos de palmitoilación, y ha tomado relevancia en virus de importancia medica como SARS-CoV-2 o CHIKV (Z. Wu et al., 2021) (Zhang et al., 2019), inicialmente se realizó la predicción de los sitios de palmitoilación en las proteínas NS3 y LC. Los resultados concuerdan con los análisis previos generados en el laboratorio, y adicionalmente se logró identificar y predecir un sitio extra de palmitoilación en NS3 y dos para LC en sitios claves que permiten y favorecen el proceso de palmitoilación.

Adicionalmente realizamos estudios *in silico* para identificar posibles HTM en la secuencia de estas proteínas, debido a que las HTM juegan un papel fundamental en la palmitoilación de proteínas solubles (tanto celulares como virales) ya que la mayoría de los sitios de palmitoilación se han identificados en la frontera entre las HTM y la región citoplásmica (Veit, 2012).

Nuestros datos sobre la predicción de HTM en las proteínas NS3 y LC mostraron resultados interesantes; en el caso de NS3, se identificaron dos regiones que se predicen como HTM debido a su composición, principalmente por contener aminoácidos hidrofóbicos, mostrando una tendencia a generar una región anfipática característica de las HTM y necesaria para su interacción con las membranas (Smertina et al., 2022). Estas HTM están localizadas en el extremo N-terminal de la proteína, lo que concuerda con el reporte previo de regiones hidrofóbicas en NS3, con potencial para interactuar con membranas y como proteína integral de membrana (Bailey, Kaiser, et al., 2010).

Integrando los datos de los sitios de palmitoilación, la cisteína 34 (C34) fue identificada en la proximidad de la segunda HTM y más aún, se encuentra expuesto en la superficie de la proteína, lo que hace suponer que juega un papel importante en el acercamiento y anclaje eficiente de la proteína y la membrana celular, similar a lo que ocurre para diversas proteínas como la proteína TF del virus Sindbis (SINV) (Ramsey, Renzi, Arnold, Trinidad, & Mukhopadhyay, 2017), la proteína NS2 del virus de la hepatitis C (HCV) (M. Wu et al., 2019) o la glicoproteína TM del virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) (González, Paladino, & Affranchino, 2012) donde las cisteínas candidatas se encuentran adyacentes a la región transmembrana (TM).

Para LC se presentaron problemas al momento de realizar la predicción, debido a la falta de homología que presenta con otras proteínas, ya que los servidores se basan en la secuencia para realizar los análisis. Sin embargo, de los cuatro servidores analizados, MEMSAT-SVM (Nugent & Jones, 2012) se logró la predicción de una HTM en su extremo C-terminal. Dicha región se ubica alejada 93 a.a de los sitios putativos de palmitoilación en las posiciones C2 y C5, de los cuales únicamente la C2 se encuentra expuesta en la superficie de la proteína, permitiendo una posible interacción con las PAT en la célula (Charollais & Van Der Goot, 2009).

Existen reportes donde se presenta un caso similar, como en la proteína de envoltura del HIV y el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV) donde las cisteínas palmitoiladas se encuentran a 50 y 130 a.a de la región de HTM, respectivamente (Yang, Spies, & Compans, 1995). A pesar de esta distancia se propone que la acilación de cisteínas en residuos lejanos a las HTM permite un acercamiento de uno de los extremos de la proteína permitiendo que la región de HTM pueda interactuar con la membrana celular y posteriormente insertarse en ella. Proponemos que este mecanismo sucede con LC, sin embargo, se requieren más análisis para confirmarlo.

El alineamiento de la secuencia de NS3 del FCV con otros miembros del género *Vesivirus*, muestra la conservación entre las cisteínas candidatas a palmitoilación, en distintos miembros, mismas que fueron analizadas por el software GPS-Palm y resultaron como posibles candidatas a palmitoilación, lo que sugiere que la palmitoilación de NS3 es necesaria para que la proteína cumpla eficientemente su función dentro del ciclo replicativo, como ocurre para la proteína ORF3 del virus de la hepatitis E (HEV) al conservar la secuencia en los 7 genotipos reportados (Gouttenoire et al., 2018).

Las predicciones bioinformáticas y las características estructurales generadas para ambas proteínas sirvieron como un primer acercamiento hacia la posible palmitoilación de las proteínas; sin embargo, se requería de evidencia experimental para poder asegurar o sugerir que la palmitoilación estaba sucediendo en las proteínas virales durante la infección o el posible efecto que esta pudiera tener sobre la biología molecular del virus

Para poder evaluar el efecto directo de la palmitoilación, se hizo uso del inhibidor de la palmitoilación por excelencia, 2-BP. Este fármaco ha sido utilizado desde hace más de 50 años como inhibidor de la palmitoilación, debido a su capacidad para unirse al sitio activo de las PAT impidiendo la transferencia del ácido palmítico hacia la proteína blanco (Davda et al., 2013). Los resultados de viabilidad indicaron que ninguna de las concentraciones probadas (10, 15 y 20  $\mu$ M) generaban algún efecto significativo en la viabilidad metabólica de las células tratadas por 5 horas con el fármaco, además de que estas concentraciones están en el rango de uso del inhibidor (Webb, Hermida-Matsumoto, & Resh, 2000).

Una vez que se determinó la concentración del inhibidor para trabajar, evaluamos los diferentes efectos que este tenía durante la infección con FCV. El primer aspecto evaluado

fue el efecto citopático de las células infectadas, que se caracteriza por una disrupción de la monocapa celular, cambio en la morfología epitelial clásica hacia un fenotipo redondeado de las células, así como la refringencia de estas. En el caso de FCV dicho efecto ya ha sido atribuido a la expresión de la vioporina LC (Abente et al., 2013) (Barrera-Vázquez, Cancio-Lonches, Miguel-Rodríguez, Valdes Pérez, & Gutiérrez-Escolano, 2019). Los resultados mostraron una reducción en el efecto citopático característico, ya que a las 5 hpi las células aún conservaban parcialmente la morfología epitelial.

Al evaluar la expresión de proteínas virales (tempranas y tardías) encontramos una disminución significativa para todas las proteínas evaluadas, la cual es dependiente de la concentración de 2-BP, ya que las células tratadas con concentraciones mayores (20  $\mu\text{M}$ ) del fármaco presentaron una disminución del aproximadamente el 90%, mientras que las células tratadas con la concentración menor (10  $\mu\text{M}$ ) la disminución fue del 50%. Estos datos correlacionan con la disminución en el efecto citopático, ya que la reducción en la síntesis de proteínas también afectó a la proteína LC y como consecuencia un menor efecto citopático generado por esta proteína. Estos resultados muestran que la palmitoilación tiene un papel importante en la síntesis de proteínas virales, sin embargo, aún no sabemos si el efecto de 2-BP afecta la palmitoilación en las proteínas del FCV o en proteínas celulares que requieren de esta modificación para su correcta participación en este proceso viral.

La producción de partículas virales también se vio afectada cuando las células fueron tratadas con el inhibidor 2-BP, dicho efecto no parece ser dependiente de la concentración del fármaco, ya que en las concentraciones probadas (10 y 15  $\mu\text{M}$ ) la disminución entre ellas no resulto significativa lo cual podría explicarse debido a una baja infectividad de las partículas virales y no tanto a la cantidad de partículas producidas, similar a lo que ocurre con el virus de la hepatitis murina (MHV) (Thorp, Boscarino, Logan, Goletz, & Gallagher, 2006). Cuando se comparan únicamente las células infectadas y tratadas con las infectadas y tratadas con el vehículo DMSO, la disminución en la cantidad de partículas fue de aproximadamente 2 logs, mismo efecto observado con MHV o HCV (M. Wu et al., 2019). Estos resultados van de la mano con lo observado en la expresión de proteínas, ya que, al existir una menor cantidad de proteína viral, por consecuencia hay menos proteína disponible para la

morfogénesis de los viriones y menos proteínas que participan en la síntesis del genoma viral como lo son NS6/7.

Si bien no se detectaron los niveles de NS3 por western blot, se puede inferir que su síntesis también se ve reducida, ya que todas las proteínas NS se generan a partir de una misma poliproteína (Sosnovtsev, Garfield, & Green, 2002), en resumen si hay una menor producción de NS6/7 también lo habría de las otras proteínas NS que se generen de la misma poliproteína.

También evaluamos el efecto de la inhibición de la palmitoilación sobre la localización subcelular de la proteína NS3 mediante IF. Esta proteína tiene una localización citoplásmica, específicamente en los CR y en la periferia celular (Bailey, Kaiser, et al., 2010) (Kaiser et al., 2006). Cuando evaluamos la localización de NS3 en células no tratadas, su localización se encontró ubicada principalmente en el citoplasma, similar a lo reportado previamente. Observamos un cambio en la localización de NS3 cuando las células infectadas son tratadas con 10  $\mu$ M de 2-BP, los puntos de localización en el citoplasma desaparecen y la proteína se puede observar distribuida por toda la célula, inclusive en el núcleo, evento que llamó nuestra atención pues hasta la fecha no se tienen reportes de proteínas del FCV que se localicen en el núcleo de las células infectadas.

Las observaciones anteriores fueron confirmadas mediante un fraccionamiento núcleo-citoplasma y analizadas mediante western blot con los marcadores específicos de pureza de cada fracción como fue indicado en la sección de Metodología. El fraccionamiento de las células infectadas no tratadas con el fármaco muestra predominantemente la identificación de la proteína en la fracción citoplásmica como era de esperarse, aunque también fue posible identificar una ligera señal de NS3 en el núcleo, esto posiblemente a la presencia de la proteína en diferentes tiempos post-infección en el núcleo o a la presencia de la proteína en el RE, que se arrastra junto con la membrana nuclear durante el fraccionamiento. Descartamos que se trate de una contaminación de la fracción ya que no se detectó el marcador citoplásmico en la fracción nuclear, mostrando que la metodología fue funciona como ya ha sido reportado (Palacios-Rápalo et al., 2021).

Por otro lado, cuando analizamos el fraccionamiento de las células infectadas y tratadas con 10  $\mu$ M del fármaco podemos observar que la detección de NS3 en el citoplasma aún se

mantiene pero en cantidades reducidas con respecto a las células infectadas no tratadas y se logró detectar a la proteína en la fracción nuclear, la cual al realizar los análisis densitométricos resultó de mayor intensidad que la obtenida en las células infectadas no tratadas con el fármaco, confirmando los resultados obtenidos en la IF. Los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis generada por Bailey y colaboradores en 2010, sobre la importancia y función de NS3 en la formación de los CR y en especial nuestra hipótesis sobre el papel de la palmitoilación, el cual sugerimos es necesario para un acercamiento de la proteína hacia las membranas del RE y posteriormente una inserción de las HTM predichas con anterioridad en este trabajo, ya que la inhibición de esta palmitoilación conllevó a cambios en la distribución y localización de la proteína, así como una menor producción de proteínas virales y progenie viral, como consecuencia de un desacople o ineficiente formación de los CR.

Es posible que la localización de NS3 en el núcleo de células infectadas por FCV se deba a su difusión a través del complejo del poro nuclear al no estar anclada a las membranas por la inhibición de la palmitoilación, o mediante el importe nuclear clásico como ocurre para NS3 de ZIKV (De Jesús-González et al., 2023), inclusive una combinación de ambas.

Adicionalmente en este trabajo logramos identificar la palmitoilación de la viroporina LC mediante la técnica de ABE. Antes de la confirmación de la palmitoilación en LC, identificamos ligeros cambios en la migración electroforética de la proteína mediante el uso de geles de tricina, esto debido a la biotinilación de la proteína, un paso importante en los ensayos ABE. La confirmación de la palmitoilación se realizó con estreptavidina en muestras tratadas con HAM. El efecto directo de la palmitoilación de LC sobre su función aún no lo podemos asegurar, pero se puede inferir debido a los efectos que se le han atribuido a LC dentro del ciclo replicativo de FCV y en un contexto libre de virus (Abente et al., 2013) (Barrera-Vázquez, Cancio-Lonches, Hernández-González, et al., 2019) (Peñaflor-Téllez et al., 2022).

Aún se requiere determinar la o las cisteínas que se palmitoilan en la secuencia de LC, sin embargo, debido a la bibliografía existente (Zhang et al., 2019) (Ramadan et al., 2022) (Žusinaite et al., 2007) podemos predecir que las más probables son las ubicadas en el extremo N-terminal lo que permitiría el doblamiento de la proteína, el transporte hacia la

membrana para su ubicación en la parte externa de las células infectadas para su posible secreción (Datos no publicados) y también permitiría la inserción de la HTM ubicada en el extremo C-terminal para poder cumplir con las funciones ya descritas.

Los resultados obtenidos durante este trabajo proporcionan evidencias sobre la importancia de la palmitoilación durante la infección de FCV en células CrFK, y los efectos que su inhibición desencadena. En el caso de NS3 dicha inhibición es responsable de una relocalización hacia el núcleo mediante el posible desacople de la proteína a los CR, sin embargo, se requieren más estudios para determinar la palmitoilación de NS3 y el efecto de esta en el funcionamiento de la proteína, así como los mecanismos que requiere para la relocalización y la posible función que tenga una vez se encuentre en el núcleo. Si bien para LC la palmitoilación se determinó, son necesarios más estudios para determinar las cisteínas que participan en esta modificación, así como corroborar la participación de la palmitoilación de LC en los procesos mencionados anteriormente.

## 8. CONCLUSIONES

Mediante análisis *in silico*:

- Se identificaron sitios putativos de palmitoilación de las proteínas NS3 y LC del FCV URB
- Se predijeron dos posibles HTM en la secuencia de NS3 ubicadas en el extremo N-terminal, y para LC una HTM en el extremo C-terminal de la proteína.
- Se modelaron las estructuras 3D para ambas proteínas, identificando los sitios de palmitoilación en regiones expuestas de la proteína.
- Se generó la topología de las HTM en las membranas celulares.
- Se identificaron NLS en la secuencia de NS3.

La palmitoilación es importante para una replicación eficiente de FCV.

La inhibición de la palmitoilación provoca una relocalización de NS3 al núcleo de las células infectadas.

La proteína LC se palmitoila durante la infección en células CrFK.

## 9. PERSPECTIVAS

- Identificar la palmitoilación de NS3 durante la infección mediante ABE.
- Cinética de infección para evaluar la localización de NS3 durante la infección.
- Determinar si la NS3 se retiene en el citoplasma por su anclaje a los CR
- Generar mutante de NS3 en las cisteínas candidatas a palmitoilación y determinar el efecto directo en las células y su localización subcelular

## 10. 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>
- Akiko, M., Masayuki, S., Takayuki, M., Kentaro, K., Yukinobu, T., & Hiroomi, A. (2006). Junctional Adhesion Molecule 1 Is a Functional Receptor for Feline Calicivirus. *Journal of Virology*, *80*(9), 4482–4490. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.9.4482-4490.2006>
- 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. *The Journal of General Virology*, *91*(Pt 3), 739–749. <https://doi.org/10.1099/vir.0.016279-0>
- Bailey, D., Karakasiliotis, I., Vashist, S., Wah Chung, L. M., Rees, J., McFadden, N., ... Goodfellow, I. (2010). Functional Analysis of RNA Structures Present at the 3' Extremity of the Murine Norovirus Genome: the Variable Polypyrimidine Tract Plays a Role in Viral Virulence. *Journal of Virology*, *84*(20), 10943. <https://doi.org/10.1128/JVI.01669-10>
- 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/https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.11.017>
- Barrera-Vázquez, O. S., Cancio-Lonches, C., Miguel-Rodríguez, C. E., Valdes Pérez, M. M., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2019). Survivin Overexpression Has a Negative Effect on Feline Calicivirus Infection. *Viruses*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/v11110996>
- Bhella, D., & Goodfellow, I. (2011). The Cryo-Electron Microscopy Structure of Feline Calicivirus Bound to

- Junctional Adhesion Molecule A at 9-Angstrom Resolution Reveals Receptor-Induced Flexibility and Two Distinct Conformational Changes in the Capsid Protein VP1. *Journal of Virology*, 85(21), 11381–11390. <https://doi.org/10.1128/JVI.05621-11>
- Blaskovic, S., Blanc, M., & van der Goot, F. G. (2013). What does S-palmitoylation do to membrane proteins? *The FEBS Journal*, 280(12), 2766–2774. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/febs.12263>
- Bordicchia, M., Fumian, T. M., Van Brussel, K., Russo, A. G., Carrai, M., Le, S.-J., ... Barrs, V. R. (2021). Feline Calicivirus Virulent Systemic Disease: Clinical Epidemiology, Analysis of Viral Isolates and In Vitro Efficacy of Novel Antivirals in Australian Outbreaks. *Viruses*, Vol. 13. <https://doi.org/10.3390/v13102040>
- Boscarino, J. A., Logan, H. L., Lacny, J. J., & Gallagher, T. M. (2008). Envelope protein palmitoylations are crucial for murine coronavirus assembly. *Journal of Virology*, 82(6), 2989–2999.
- Brigidi, S. G., & Bamji, S. X. (2013). Detection of Protein Palmitoylation in Cultured Hippocampal Neurons by Immunoprecipitation and Acyl-Biotin Exchange (ABE). *J. Vis. Exp.*, (72), e50031. <https://doi.org/doi:10.3791/50031>
- Charollais, J., & Van Der Goot, F. G. (2009). Palmitoylation of membrane proteins (Review). *Molecular Membrane Biology*, 26(1–2), 55–66. <https://doi.org/10.1080/09687680802620369>
- Cho, E., & Park, M. (2016). Palmitoylation in Alzheimers disease and other neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*, 111, 133–151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.06.008>
- Clarke, I. N., & Lambden, P. R. (1997). The molecular biology of caliciviruses. *The Journal of General Virology*, 78 ( Pt 2), 291–301. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-2-291>
- 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>
- Davda, D., El Azzouny, M. A., Tom, C. T. M. B., Hernandez, J. L., Majmudar, J. D., Kennedy, R. T., & Martin, B. R. (2013). Profiling Targets of the Irreversible Palmitoylation Inhibitor 2-Bromopalmitate. *ACS Chemical Biology*, 8(9), 1912–1917. <https://doi.org/10.1021/cb400380s>
- De Jesús-González, L. A., Palacios-Rápalo, S. N., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Farfán-Morales, C. N., Cordero-Rivera, C. D., ... Del Ángel, R. M. (2023). Nucleo-Cytoplasmic Transport of ZIKV Non-Structural 3 Protein Is Mediated by Importin- $\alpha/\beta$  and Exportin CRM-1. *Journal of Virology*, 97(1), e0177322. <https://doi.org/10.1128/jvi.01773-22>
- Desselberger, U. (2019). Caliciviridae Other Than Noroviruses. *Viruses*, Vol. 11. <https://doi.org/10.3390/v11030286>

- Doerflinger, S. Y., Cortese, M., Romero-Brey, I., Menne, Z., Tubiana, T., Schenk, C., ... Lohmann, V. (2017). Membrane alterations induced by nonstructural proteins of human norovirus. *PLOS Pathogens*, *13*(10), e1006705. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006705>
- Eden, J.-S., Sharpe, L. J., Whit, P. A., & Brown, A. J. (2011). Norovirus RNA-Dependent RNA Polymerase Is Phosphorylated by an Important Survival Kinase, Akt. *Journal of Virology*, *85*(20), 10894–10898. <https://doi.org/10.1128/JVI.05562-11>
- González, S. A., Paladino, M. G., & Affranchino, J. L. (2012). Palmitoylation of the feline immunodeficiency virus envelope glycoprotein and its effect on fusion activity and envelope incorporation into virions. *Virology*, *428*(1), 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.03.005>
- Goodfellow, I. (2011). The genome-linked protein VPg of vertebrate viruses - a multifaceted protein. *Current Opinion in Virology*, *1*(5), 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.09.003>
- Goodfellow, I., & Taube, S. (2016). *Calicivirus Replication and Reverse Genetics* (L. Svensson, U. Desselberger, H. B. Greenberg, & M. K. B. T.-V. G. Estes, Eds.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802241-2.00017-1>
- Gouttenoire, J., Pollán, A., Abrami, L., Oechslin, N., Mauron, J., Matter, M., ... Moradpour, D. (2018). Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 protein and is required for infectious particle secretion. *PLOS Pathogens*, *14*(12), e1007471. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007471>
- Graziano, V. R., Wei, J., & Wilen, C. B. (2019). Norovirus Attachment and Entry. *Viruses*, Vol. 11. <https://doi.org/10.3390/v11060495>
- Green, K. Y., Aaron, M., Fogg, M., Weisberg, A., Belliot, G., Wagner, M., ... Sosnovtsev, S. (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>
- 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>
- Hongxia, W., Jiapi, H., Yongxiang, L., Yudi, P., Yin, L., Qian, M., ... Jin, T. (2021). Feline Calicivirus Proteinase-Polymerase Protein Degrades mRNAs To Inhibit Host Gene Expression. *Journal of Virology*, *95*(13), e00336-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00336-21>
- 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>

- Korycka, J., Łach, A., Heger, E., Bogusławska, D. M., Wolny, M., Toporkiewicz, M., ... Sikorski, A. F. (2012). Human DHHC proteins: A spotlight on the hidden player of palmitoylation. *European Journal of Cell Biology*, 91(2), 107–117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.09.013>
- Kumar, R., Mehta, D., Mishra, N., Nayak, D., & Sunil, S. (2021). Role of Host-Mediated Post-Translational Modifications (PTMs) in RNA Virus Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22010323>
- Li, X., Shen, L., Xu, Z., Liu, W., Li, A., & Xu, J. (2022). Protein Palmitoylation Modification During Viral Infection and Detection Methods of Palmitoylated Proteins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 821596. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.821596>
- Mahar, J. E., Bok, K., Green, K. Y., & Kirkwood, C. D. (2013). The Importance of Intergenic Recombination in Norovirus GII.3 Evolution. *Journal of Virology*, 87(7), 3687–3698. <https://doi.org/10.1128/JVI.03056-12>
- Meyers, G., Wirblich, C., & Thiel, H. J. (1991). Rabbit hemorrhagic disease virus--molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology*, 184(2), 664–676. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90436-f](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90436-f)
- Mizenko, R. R., Brostoff, T., Jackson, K., Pesavento, P. A., & Carney, R. P. (2022). Extracellular Vesicles (EVs) Are Copurified with Feline Calicivirus, yet EV-Enriched Fractions Remain Infectious. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e0121122. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01211-22>
- Nugent, T., & Jones, D. T. (2012). Detecting pore-lining regions in transmembrane protein sequences. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 169. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-169>
- Oka, T., Takagi, H., & Tohya, Y. (2014). Development of a novel single step reverse genetics system for feline calicivirus. *Journal of Virological Methods*, 207, 178–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.004>
- Olsper, A., Hosmillo, M., Chaudhry, Y., Peil, L., Truve, E., & Goodfellow, I. (2016). Protein-RNA linkage and posttranslational modifications of feline calicivirus and murine norovirus VPg proteins. *PeerJ*, 4, e2134. <https://doi.org/10.7717/peerj.2134>
- Palacios-Rápalo, S. N., De Jesús-González, L. A., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Farfan-Morales, C. N., Gutiérrez-Escolano, A. L., & del Ángel, R. M. (2021). Nuclear localization of non-structural protein 3 (NS3) during dengue virus infection. *Archives of Virology*, 166(5), 1439–1446. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05026-w>
- Peñaflor-Téllez, Y., Chávez-Munguía, B., Lagunes-Guillén, A., Salazar-Villatoro, L., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2022). The Feline Calicivirus Leader of the Capsid Protein Has the Functional Characteristics of a Viroporin. *Viruses*, Vol. 14. <https://doi.org/10.3390/v14030635>

- Peñaflor-Téllez, Y., Trujillo-Uscanga, A., Escobar-Almazán, J. A., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2019). Immune Response Modulation by Caliciviruses. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2334. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02334>
- Pesavento, P. A., Chang, K.-O., & Parker, J. S. L. (2008). Molecular Virology of Feline Calicivirus. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, *38*(4), 775–786. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.03.002>
- Radford, A., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., ... Horzinek, M. C. (2009). Feline calicivirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, *11*(7), 556–564. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.004>
- Radford, A. D., Coyne, K. P., Dawson, S., Porter, C. J., & Gaskell, R. M. (2007). Feline calicivirus. *Veterinary Research*, *38*, 319–335. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006056>
- Ramadan, A. A., Mayilsamy, K., McGill, A. R., Ghosh, A., Giulianotti, M. A., Donow, H. M., ... Roy, A. (2022). Identification of SARS-CoV-2 Spike Palmitoylation Inhibitors That Results in Release of Attenuated Virus with Reduced Infectivity. *Viruses*, Vol. 14. <https://doi.org/10.3390/v14030531>
- Ramsey, J., Renzi, E. C., Arnold, R. J., Trinidad, J. C., & Mukhopadhyay, S. (2017). Palmitoylation of Sindbis Virus TF Protein Regulates Its Plasma Membrane Localization and Subsequent Incorporation into Virions. *Journal of Virology*, *91*(3), 10.1128/jvi.02000-16. <https://doi.org/10.1128/jvi.02000-16>
- Romero-Brey, I., & Bartenschlager, R. (2014). Membranous Replication Factories Induced by Plus-Strand RNA Viruses. *Viruses*, Vol. 6, pp. 2826–2857. <https://doi.org/10.3390/v6072826>
- Rossman, J. S., Jing, X., Leser, G. P., Balannik, V., Pinto, L. H., & Lamb, R. A. (2010). Influenza virus m2 ion channel protein is necessary for filamentous virion formation. *Journal of Virology*, *84*(10), 5078–5088.
- Sandoval-Jaime, C., Green, K. Y., & Sosnovtsev, S. V. (2015). Recovery of murine norovirus and feline calicivirus from plasmids encoding EMCV IRES in stable cell lines expressing T7 polymerase. *Journal of Virological Methods*, *217*, 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.02.003>
- Schaad, M. C., Jensen, P. E., & Carrington, J. C. (1997). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *The EMBO Journal*, *16*(13), 4049–4059. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.4049>
- Smertina, E., Carroll, A. J., Boileau, J., Emmott, E., Jenckel, M., Vohra, H., ... Frese, M. (2022). Lagovirus Non-structural Protein p23: A Putative Viroporin That Interacts With Heat Shock Proteins and Uses a Disulfide Bond for Dimerization . *Frontiers in Microbiology* , Vol. 13. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.923256>
- Smertina, E., Hall, R. N., Urakova, N., Strive, T., & Frese, M. (2021). Calicivirus Non-structural Proteins:

- Potential Functions in Replication and Host Cell Manipulation. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 712710. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.712710>
- Sobocinska, J., Roszczenko-Jasinska, P., Ciesielska, A., & Kwiatkowska, K. (2018). Protein palmitoylation and its role in bacterial and viral infections. *Frontiers in Immunology*, *8*(JAN), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.02003>
- Sosnovtsev, S. V., & Green, K. Y. (2003). Feline calicivirus as a model for the study of calicivirus replication. *Perspectives in Medical Virology*, *9*, 467–488. [https://doi.org/10.1016/s0168-7069\(03\)09028-1](https://doi.org/10.1016/s0168-7069(03)09028-1)
- Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K.-O., Onwudiwe, O., & Green, K. Y. (2005). Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *Journal of Virology*, *79*(7), 4012–4024. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.4012-4024.2005>
- 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>
- Thorp, E. B., Boscarino, J. A., Logan, H. L., Goletz, J. T., & Gallagher, T. M. (2006). Palmitoylations on murine coronavirus spike proteins are essential for virion assembly and infectivity. *Journal of Virology*, *80*(3), 1280–1289. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1280-1289.2006>
- Veit, M. (2012). Palmitoylation of virus proteins. *Biology of the Cell*, *104*(9), 493–515. <https://doi.org/10.1111/boc.201200006>
- Veit, M., Serebryakova, M. V., & Kordyukova, L. V. (2013). Palmitoylation of influenza virus proteins. *Biochemical Society Transactions*, *41*(1), 50–55. <https://doi.org/10.1042/BST20120210>
- Vinje, J., Estes, M. K., Esteves, P., Green, K. Y., Katayama, K., Knowles, N. J., ... Consortium, I. R. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *The Journal of General Virology*, *100*(11), 1469–1470. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001332/CITE/REFWORKS>
- Vongpunsawad, S., Prasad Venkataram, B. ., & Estes, M. K. (2013). Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *Journal of Virology*, *87*(9), 4818–4825. <https://doi.org/10.1128/JVI.03508-12>
- Webb, Y., Hermida-Matsumoto, L., & Resh, M. D. (2000). Inhibition of Protein Palmitoylation, Raft Localization, and T Cell Signaling by 2-Bromopalmitate and Polyunsaturated Fatty Acids \*. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(1), 261–270. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.261>
- Wu, M., Shanmugam, S., Welsch, C., & Yi, M. (2019). Palmitoylation of hepatitis C virus NS2 regulates its subcellular localization and NS2-NS3 autocleavage. *Journal of Virology*, *94*(1), e00906-19.
- Wu, Z., Zhang, Z., Wang, X., Zhang, J., Ren, C., Li, Y., ... Ma, C. (2021). Palmitoylation of SARS-CoV-2 S

protein is essential for viral infectivity. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1–4.

Yang, C., Spies, C. P., & Compans, R. W. (1995). The human and simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein transmembrane subunits are palmitoylated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(21), 9871–9875. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9871>

Zaballa, M.-E., & van der Goot, F. G. (2018). The molecular era of protein S-acylation: spotlight on structure, mechanisms, and dynamics. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 53(4), 420–451. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1488804>

Zhang, N., Zhao, H., & Zhang, L. (2019). Fatty Acid Synthase Promotes the Palmitoylation of Chikungunya Virus nsP1. *Journal of Virology*, 93(3), e01747-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01747-18>

Žusinaite, E., Tints, K., Kiiver, K., Spuul, P., Karo-Astover, L., Merits, A., & Sarand, I. (2007). Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. *The Journal of General Virology*, 88(Pt 7), 1977–1985. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82865-0>