



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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS
MOLECULAR**

**“Estudio de la secreción de la viroporina líder de la cápside (LC)
de células CrFK infectadas con el Calicivirus felino”**

T E S I S

Que presenta

Q.B.P. Erick Ignacio Monge Celestino

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

Infectómica y Patogénesis Molecular

Directora de Tesis: Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Ciudad de México

julio del 2023

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	9
1.1) Familia <i>Caliciviridae</i>	9
1.2) <i>Calicivirus felino</i> y su organización genómica.....	10
1.3) Ciclo replicativo del <i>Calicivirus felino</i>	11
1.4) La proteína LC induce apoptosis en un contexto de transfección.....	13
1.5) La proteína LC es una viroporina.....	15
1.6) Secreción de viroporinas.....	17
3) Hipótesis.....	19
4) Objetivo general.....	19
5) Objetivos específicos.....	19
6.1) Cultivo celular.....	20
6.2) propagación e infección viral.....	20
6.3) Extractos proteicos celulares.....	21
6.4) Ensayos de Western blot.....	21
6.5) Precipitación de proteínas totales de sobrenadante.....	22
6.6) Ensayos de SYTOX Green™.....	22
6.7) Viabilidad celular mediante MTT.....	23
6.8) Centrifugación diferencial para la obtención de vesículas extracelulares.....	23
6.9) Purificación de vesículas extracelulares para microscopía electrónica de transmisión.....	25
6.10) Transformación de bacterias quimiocompetentes por choque térmico.....	26
6.11) Inducción de expresión por IPTG.....	26
6.12) Enriquecimiento de cuerpos de inclusión.....	26
6.13) ELISA tipo sandwich para la detección de la viroporina LC en sobrenadantes.....	27
6.14) Análisis estadístico.....	28
7.0) Diagrama de trabajo.....	29
7.1) Objetivo 1.....	29
7.2) Objetivo 2.....	30
8.3) Objetivo 3.....	31
8.0) Resultados.....	32
8.1) Cinética de expresión del ORF 2 de FCV en la replicación viral.....	32
8.2) La viroporina LC se encuentra en sobrenadantes de células CrFK infectadas con FCV.....	33

8.3) La presencia de la proteína LC del FCV en el sobrenadante no es producto de una permeabilización de la membrana plasmática durante la infección.	34
8.4) Viabilidad celular de células CrFK en la infección por FCV.....	37
8.5) La viroporina LC se asocia a vesículas extracelulares.	38
8.6) La viroporina LC se encuentra en la fracción soluble y forma oligómeros en condiciones no reductoras.	42
8.7 Desarrollo de un método de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) para la cuantificación de la viroporina LC en sobrenadantes de células infectadas.	44
8.7.1 Expresión y purificación de la proteína recombinante Histag-LC.	44
8.7.2 Estandarización de la prueba de ELISA para la detección de LC.	45
8.7.3) Identificación de la viroporina LC en sobrenadantes de cultivos celulares mediante la prueba de ELISA.....	47
9) Discusión	48
10) Conclusiones	54
11) Perspectivas	54
12) Bibliografía	55

Este trabajo se realizó en el laboratorio 9, bajo la tutoría 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 bajo la asesoría de la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres¹ y el Dr. Pavel Isa².

¹Investigador titular del Depar titular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de investigación y de Estudio Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

²Investigador titular A del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México

Financiamiento

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría con número de registro: CVU 1145718.

Este trabajo de tesis fue realizado con el apoyo del CONACYT, Proyecto, 302965, PRONAI13: Infecciones virales del tracto gastrointestinal.

Dedicatorias

A mi madre Barbara, quien con amor me enseñó a vivir y luchar día a día, codo a codo, juntos e invencibles contra el mundo.

A mis hermanos Ana, Olga y Bladi.

A Doña Divina y Don Nacho, quienes me enseñaron a amar al campo, la tierra, la lluvia, el olor a leña y al café por las mañanas. Espero y compartan mi alegría allá en el cielo.

Agradecimientos

A mi directora de tesis, Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, por su paciencia, por confiar en mí y brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Mi admiración, cariño y respeto.

A mis asesores, Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres y al Dr. Pavel Isa. Por sus consejos, reactivos y sugerencias para la realización de este trabajo.

Al Dr. Juan Ernesto Ludert León, por sus charlas y consejos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Carolina, Yoatzin, Adriana, Randy, Sharon y Jaury, quienes me compartieron sus conocimientos e hicieron amena mi estancia en el laboratorio.

A mi gran amiga Mariam, por apoyarme en el ámbito académico y personal desde el día en que iniciamos esta etapa profesional.

A Rabit y Yazmin, por siempre estar cuando los necesito.

Al M.C. Carlos Cordero, por su apoyo en el desarrollo de algunas técnicas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Daniel Talamás Lara, por su apoyo y disponibilidad en las microscopías electrónicas de transmisión.

A todo el colegio de profesores del departamento, por contribuir en mi formación profesional.

Resumen

La proteína líder de la cápside (LC) es exclusiva de los miembros del género *Vesivirus*, en la familia *Caliciviridae* y se ha comprobado que es responsable del efecto citopático característico de la infección producida por el Calicivirus felino (FCV). En estudios realizados por nuestro laboratorio se demostró que al expresar a LC en un contexto libre de virus, esta tiene una localización mitocondrial e induce apoptosis por la vía intrínseca con la consecuente degradación de proteínas antiapoptóticas como survivina, X-IAP y la activación de caspasas. Continuando la caracterización de esta proteína se encontró que puede formar oligómeros, es intrínsecamente tóxica cuando se expresa en bacterias y puede permear membranas celulares cuando se interacciona exógenamente con monocapas de células. Todas estas son características de vioporinas. Las vioporinas son proteínas pequeñas codificadas en una amplia variedad de virus, se asocian a membranas celulares y participan en la replicación y en la citopatogénesis de la infección. Se ha reportado que algunas vioporinas pueden secretarse de células infectadas hacia el medio extracelular, como la proteína NSP4 de rotavirus y el péptido delta del virus del Ébola. Resultados de nuestro grupo de trabajo demostraron que LC se asocia a la membrana plasmática y presente en los sobrenadantes de células infectadas. En este trabajo se corroboró la presencia de la proteína LC en los sobrenadantes de células CrFK infectadas con el FCV, cuya membrana plasmática se encuentra íntegra, sugiriendo que la proteína LC se secreta. Finalmente, se determinó que LC se encuentra asociada a vesículas extracelulares mediante ensayos de western blot. Para corroborar y cuantificar la presencia de la proteína LC en los sobrenadantes de las células infectadas se desarrolló un ensayo de ELISA. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la vioporina LC pudiera actuar como un factor de virulencia importante para el mantenimiento y diseminación de la infección.

Abstract

The Leader of the Capsid (LC) is an exclusive for the members of the Vesivirus genera, in the family Caliciviridae, and it has been proven that it's responsible for the characteristic cytopathic effect of infection produced by feline Calicivirus (FCV). In studies carried out by our laboratory, it was revealed that when LC is expressed in a virus-free context, it has a mitochondrial location and induces apoptosis through the intrinsic pathway with the consequent degradation of antiapoptotic proteins such as survivin, X-IAP and caspase activation. Continuing with the characterization of this protein, it was found that it can form oligomers, it is intrinsically toxic when expressed in bacteria, and it can permeate cell membranes when interacts exogenously with cell monolayers. All of these are characteristics of viroporins. These are small proteins encoded by many viruses, which can associate with cell membranes and participate in replication and in the cytopathogenesis of infection. It has been reported that some viroporins can be secreted from infected cells into the extracellular environment, such as the rotavirus NSP4 protein and the Ebola virus delta peptide. The results of our working group demonstrated that LC is associated with the plasma membrane and is present in the supernatants of infected cells. In this work we demonstrated that plasmatic membrane is integrated in the FCV infection, suggesting that the LC protein is secreted. Finally, LC was found to be associated with extracellular vesicles by western blot assays. To corroborate and quantify the presence of the LC protein in the supernatants of infected cells, an ELISA assay was developed. The results obtained in this work suggest that LC viroporin could act as an important virulence factor for the maintenance and spread of the infection.

INTRODUCCIÓN

1.1) Familia *Caliciviridae*.

La familia *Caliciviridae* está compuesta por virus pequeños, no envueltos, que miden entre 27 y 40 nanómetros (nm) de diámetro, con simetría icosaédrica y con un genoma de RNA monocatenario de sentido positivo (ssRNA) (Knipe & Howley, 2013). Se clasifican en once géneros de los cuales siete infectan a mamíferos (*Lagovirus*, *Norovirus*, *Nebovirus*, *Recovirus*, *Valovirus* y *Vesivirus*), dos a aves (*Babovirus* y *Nacovirus*) y dos a peces (*Minovirus* y *Salovirus*) (Vinjé et al., 2019). Los *Norovirus* y *Sapovirus*, agrupados como calicivirus humanos (HuCV) son un problema de salud pública a nivel mundial ya que son responsables de brotes de gastroenteritis aguda no bacteriana en humanos. Se estima que anualmente mueren entre 70,000 y 200,000 personas por infecciones relacionadas con infecciones producidas por norovirus (HuNoV) en países en vías de desarrollo (Ahmed et al., 2014). Por otro lado, la infección por sapovirus causa gastroenteritis aguda esporádica, especialmente en niños pequeños y se han reportado brotes en todos los grupos de edad y en países en vías de desarrollo (Oka et al., 2015).

La enfermedad causada por la infección por HuCV se caracteriza por la aparición repentina de vomito, diarrea severa y dolores abdominales (Atmar & Estes, 2006). La transmisión ocurre directamente de persona a persona, por la ruta fecal-oral, ya sea por aerosoles provenientes del vomito, o por el consumo de agua y alimentos contaminados (Pringle et al., 2015). Actualmente no existe algún tratamiento farmacológico eficaz; sin embargo, existen estudios preclínicos donde se utilizan fármacos dirigidos contra diferentes blancos moleculares del virus (Netzler et al., 2019). Por ejemplo, se han probado algunos inhibidores de la polimerasa, inhibidores de la proteasa NS6 (Kim et al., 2012) y algunos inmunomoduladores (Maloney et al., 2012). Estos estudios se han visto obstaculizados debido a que los HuNoV no se pueden propagar eficientemente en cultivo celular. En los últimos años, se han desarrollado sistemas celulares novedosos donde es reproducible la infección. Por ejemplo, cultivos en linfocitos B (Jones et al., 2015) y en enteroides intestinales (Ettayebi et al., 2016). Debido a la falta de un sistema *in vitro* eficiente para el estudio de los HuNoV, se han usado a otros virus de la familia como modelo,

en donde se incluyen el Norovirus murino (MNV), miembro del género *Norovirus*, el *Sapovirus* porcino (PsaV), miembro del género *Sapovirus* y el *Calicivirus felino* (FCV), miembro del género *Vesivirus* (Revisado en: Vashist et al., 2009). Todos ellos han sido modelos de suma importancia para entender procesos básicos de la biología y patología de los virus de esta familia.

1.2) *Calicivirus felino* y su organización genómica.

El FCV es causante de una enfermedad del tracto respiratorio superior en felinos domésticos y silvestres, aunque se ha reportado que algunas cepas causan enfermedades sistémicas y en ocasiones gastrointestinales (Desselberger, 2019). Hasta hace algunos años este era el único calicivirus que podía propagarse en líneas celulares y por lo tanto ha sido uno de los mejores modelos para entender su biología (Makino et al., 2006).

El genoma de FCV es de un tamaño aproximado de 7.5 kb, monocatenario, de polaridad positiva, no segmentado y está unido covalentemente con una proteína denominada VPg en la región 5', la cual tiene una función muy importante en la regulación de la traducción de las proteínas virales; el extremo 3' se encuentra poliadenilado (Knipe & Howley, 2013). Este genoma se encuentra organizado en 3 marcos de lectura abiertos (ORFs). El ORF1 codifica a una poliproteína la cual se escinde por acción de la proteasa viral para producir 6 proteínas no estructurales (NS1 a NS6/7) (Sosnovtsev et al., 2002). El ORF2 codifica un precursor que al procesarse produce a la proteína mayoritaria de la cápside (VP1) madura y a una proteína pequeña denominada líder de la cápside (LC), y por último el ORF3 codifica a la proteína minoritaria de la cápside (VP2) (Sosnovtsev & Green, 2000). (Figura 1).

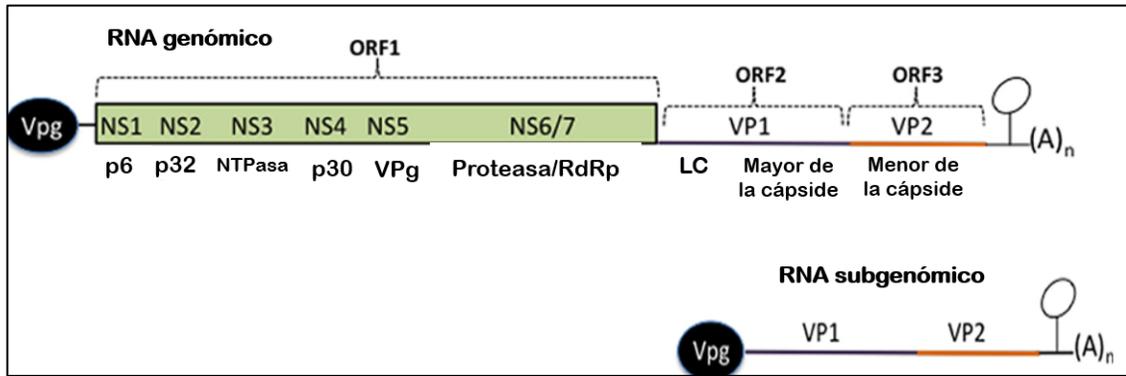


Figura 1) Organización genómica del FCV. El genoma del FCV codifica 3 marcos de lectura abiertos (ORF); el ORF1 codifica a las proteínas no estructurales (NS) 1 o p6, NS2 o p32, NS3 o p39, NS4 o p30, NS5 o VPg y NS6/7 o proteasa/RdRp. En el ORF 2 y 3 se codifican la proteína no estructural LC y las proteínas estructurales VP1 y VP2, las cuales conforman a la cápside de los viriones y su traducción es a partir de un RNA subgenómico. La proteína VPg se encuentra unida covalentemente en el extremo 5' de ambos RNAs (genómico y subgenómico) y se encuentran poliadenilados en sus extremos 5'. Modificado de (Peñaflor-Téllez et al., 2019)

1.3) Ciclo replicativo del *Calicivirus felino*.

El ciclo replicativo del FCV comienza cuando la partícula viral se une con el ácido siálico $\alpha 2,6$ que se encuentra en la superficie de la membrana plasmática y actúa como una molécula de unión. Posteriormente, ocurre una interacción con la molécula de adhesión felina (fJAM-1), que actúa como un receptor (Makino et al., 2006; Stuart & Brown, 2007). Tras la unión del virus con su receptor, ocurre la entrada del virión mediante endocitosis dependiente de clatrina o pH, lo que subsecuentemente conlleva a la maduración del endosoma y en este proceso se dan cambios estructurales en la cápside del virión que ayudan a la salida del genoma al citoplasma de la célula para iniciar el proceso de traducción de proteínas virales. En un estudio reciente se observó que después de la interacción de FCV con un fragmento soluble del receptor fJAM-1, 12 moléculas de la proteína VP2 forman ensamblajes que se asemejan a una entrada o portal, con algunos extremos N hidrofóbicos de la VP2 en dirección opuesta o lejana a la superficie viral, formando un poro en la cubierta de la cápside que permite que el genoma viral sea exitosamente depositado en el citoplasma celular (Conley et al., 2019).

El inicio de la traducción comienza con el reclutamiento de la subunidad ribosomal 40S en el extremo 5' del RNA mensajero (mRNA), mediada por la VPg, favoreciendo el ensamble del ribosoma y reclutando factores canónicos de la célula (Revisado en: Gutiérrez-Escolano, 2014). El ORF1 se traduce en una poliproteína viral la cual es procesada co-traduccionalmente para dar origen a 6 proteínas no estructurales: NS1/2, la helicasa viral NS3, NS4, NS5 o VPg y la proteasa-polimerasa viral NS6/7, que a diferencia de otros calicivirus no sufre procesamientos adicionales (Sosnovtsev et al., 2002). El papel de todas las proteínas NS no está del todo claro ya que varía entre los diferentes virus de la familia.

Durante la infección por FCV NS1/2 se procesa y se obtienen 2 proteínas de 32 y 5.6 kDa y se sabe que están involucradas en la alteración de membranas, promoviendo la formación de los complejos de replicación los cuales son de suma importancia para evitar el reconocimiento y activación del sistema inmune, promoviendo así un ambiente óptimo para la replicación viral. La proteína NS3 está ampliamente conservada en la familia de los calicivirus y se le ha descrito una función de NTPasa y chaperona. NS4 también está descrita como una proteína relacionada en el rearrreglo de membranas (Bailey et al., 2010). La proteína NS5 también conocida como VPg, está unida covalentemente con el RNA genómico y subgenómico viral; ayudando al reclutamiento y ensamblaje de factores canónicos de la traducción y promoviendo la síntesis de las proteínas virales (Goodfellow et al., 2005). A la proteína NS6 se le conoce también como proteinasa 3C-like y es la única proteasa codificada por el virus, responsable del procesamiento de la poliproteína viral y de participar en el establecimiento de la infección. La proteína NS7 es la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) o replicasa viral, que se encarga de la replicación del RNA para dar origen al RNA de sentido negativo (ssRNA-), el cual sirve de molde para la producción de los RNA genómicos (ssRNAg+) y los RNA subgenómicos (sgRNA). En los vesivirus las proteínas NS6 y 7 están fusionadas, constituyendo a la proteasa-polimerasa viral. Tanto los RNAg como los RNAsg están unidos a la proteína VPg, la cual en ambos casos, promueve su traducción (Oka et al., 2007). A pesar de que los ORF 2 y 3 están codificados en el RNAg, su traducción ocurre principalmente a partir del RNAsg, el cual contiene codificados

exclusivamente a los ORF 2 y 3. A partir del ORF2 se produce la proteína mayoritaria de cápside (VP1) como un precursor que es posteriormente procesado para producir a la VP1 madura y a una proteína de 14 kDa conocida como la proteína líder de la cápside (LC). Por último, la traducción del ORF 3 da como resultado a la proteína minoritaria de la cápside (VP2), la cual es muy importante para la infectividad del virión, proporciona una mayor estabilidad a la cápside y ayuda a la liberación del RNAg del endosoma al citoplasma celular (Sosnovtsev et al., 2005). El ensamble de los viriones maduros ocurre en estos complejos de replicación y se sabe que la liberación de los viriones se favorece por la inducción de la apoptosis, como sucede en otros virus no envueltos (Berger & Danthi, 2013; Robinson et al., 2019) (Figura 2).

1.4) La proteína LC induce apoptosis en un contexto de transfección.

La proteína LC, es esencial para la replicación y es única de los *Vesivirus*. El producto inicial de la traducción es una poliproteína de 75 kDa, conocida como precursor LC-VP1, que posteriormente es escindida por la proteasa viral, produciendo a la proteína estructural de la cápside VP1 madura, de 60 kDa y a la proteína LC, la cual está constituida por 124 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 14 kDa.

La proteína LC, no presenta homología de secuencia con otras proteínas y contiene dos regiones conservadas (CR), denominadas CRI y CRII. La CRI se caracteriza por tener tres cisteínas y una prolina conservadas y la CRII posee 3 prolinas conservadas (Abente et al., 2013; Sosnovtsev et al., 1998).

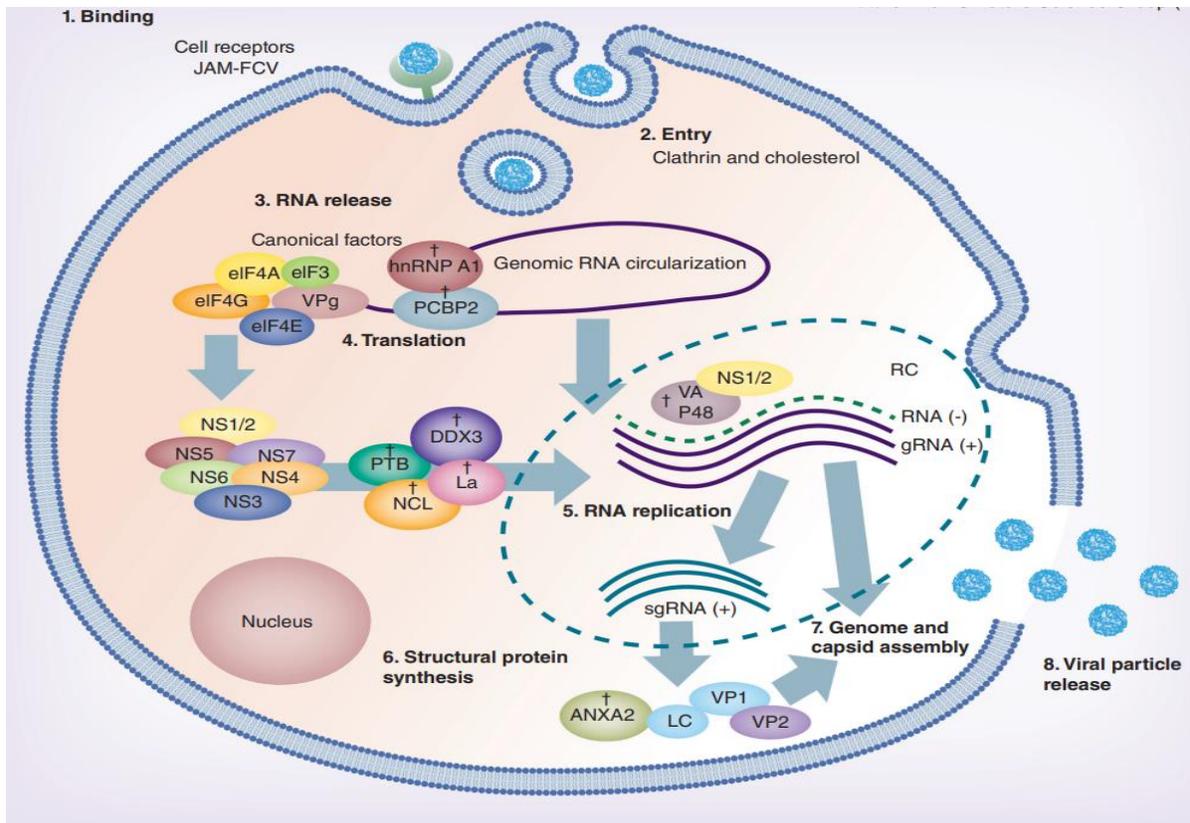


Figura 2) Esquema del ciclo replicativo de FCV. Después de la interacción de la partícula viral de FCV con el receptor fJAM-1 se da la internalización del virión por vía endocítica mediada por receptor. La acidificación del endosoma provoca cambios estructurales en la cápside viral facilitando la salida del genoma viral al citoplasma de la célula huésped y se comienza con la traducción del RNA viral, mediada por la proteína VPg; se produce una poliproteína que se procesa en proteínas no estructurales, las cuales inducen en la célula infectada un ambiente óptimo para la replicación viral. La formación de los complejos de replicación es un paso importante para la replicación del genoma, donde se produce el gRNA y sgRNA. A partir de este último se sintetizan las proteínas estructurales VP1 y VP2, que conllevan al ensamblaje de nuevas partículas virales y cuya diseminación se favorece por la inducción de apoptosis (Imagen tomada de Gutiérrez-Escolano 2014).

Mutaciones en las cisteínas de la CRI tienen impacto en la inducción del efecto citopático producido durante la infección, por lo que esta región se considera importante para este proceso. Además, las mutaciones en las tres prolinas de la CRII también conducen a un menor efecto citopático, sugiriendo de igual forma su participación. Las mutaciones en ambas regiones tienen como consecuencia la disminución de la progenie viral (Abente et al., 2013).

Nuestro grupo de trabajo reportó que la proteína LC expresada en células CrFK en un contexto libre de infección, provoca una relocalización de la proteína mitocondrial Smac/DIABLO hacia el citoplasma, con la consecuente degradación de proteínas celulares antiapoptóticas como XIAP y survivina, y la consecuente activación de la caspasa 3, responsable de la inducción de la apoptosis vía intrínseca. Asimismo, la proteína LC se observó localizada en la membrana externa mitocondrial. Sin embargo, todavía quedan varias preguntas que contestar sobre su caracterización y mecanismo de acción en las células infectadas (Barrera-Vázquez et al., 2019).

1.5) La proteína LC es una viroporina.

Una viroporina se define como una o un conjunto de proteínas virales que tienen la capacidad de ensamblarse e insertarse en la membrana de la célula huésped y formar un poro transmembrana hidrofílico, pueden formar oligómeros y tienen una carga definida que permite que algunos iones o solutos pequeños atraviesen las membranas de células infectadas mediante un gradiente electroquímico (Breitinger et al., 2022). Se clasifican en clase I y II, según sus dominios transmembrana (Figura 2). Otra característica es que los dominios amino y carboxilo pueden ser luminal o citosólico y esto es determinante para su clasificación en subgrupos (Nieva et al., 2012) (Figura 3).

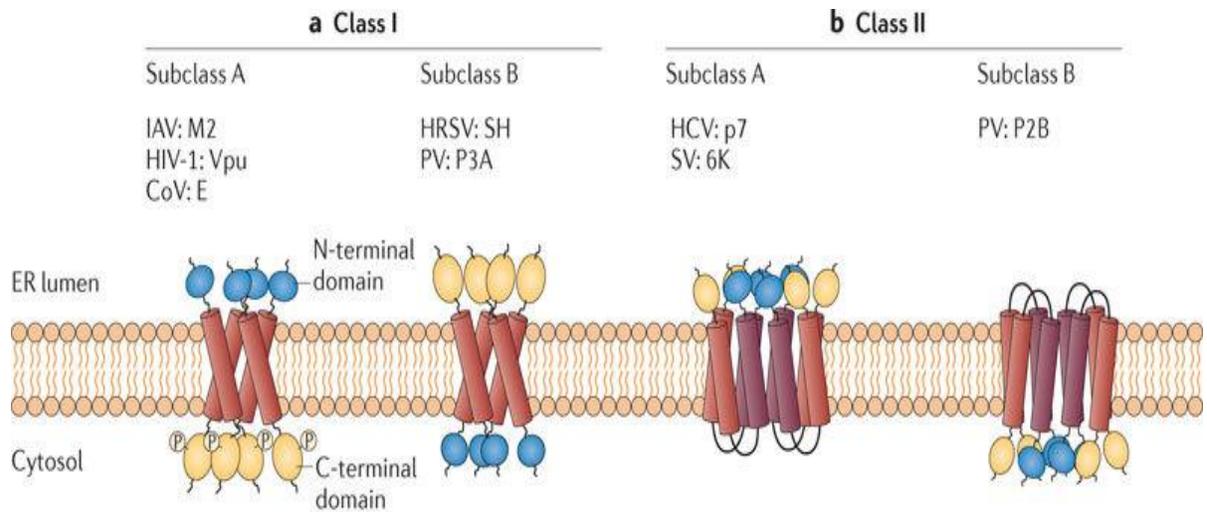


Figura 3) Clasificación de viroporinas respecto al número de dominios transmembrana y su topología en las membranas celulares. Las viroporinas clase I contienen un dominio que atraviesa a la membrana y se dividen en subclase A y B. Las viroporinas clase II se distinguen por la formación de motivos de horquillas que atraviesan las membranas y están divididos en subclases. Los miembros de la subclase A contienen el carboxilo y el amino terminal de lado luminal y la subclase B se caracteriza por la orientación citosólica del carboxilo y amino terminal (Tomado de Nieva et al., 2012).

Recientemente nuestro grupo de trabajo reportó que la proteína LC de FCV tiene características de viroporina, puede formar oligómeros mediante puentes disulfuro y cuando se expresa en bacterias es toxica ya que induce la formación de cuerpos plasmolíticos similares a los que se producen cuando hay un estrés osmótico. Además, mediante análisis bioinformáticos se determinó que esta proteína tiene una firma molecular similar al de las defensinas y a la viroporina no clásica del virus del Ebola, también conocida como péptido delta (Peñaflor-Téllez et al., 2022). Actualmente nuestro laboratorio estudia la localización subcelular durante la infección y se ha determinado que se localiza en el citoplasma y principalmente en la membrana plasmática (datos no publicados); sin embargo, la(s) función(es) que cumple durante la infección aún se desconocen.

1.6) Secreción de vioporinas

Las vioporinas tienen como blanco a diferentes organelos o compartimentos celulares, también pueden ser factores de virulencia y su eliminación total o parcial frecuentemente reduce la liberación de viriones y repercute en la patogenicidad, lo que destaca su importancia en el ciclo replicativo viral. Por ejemplo, la vioporina 2B de poliovirus forma poros en el Retículo Endoplásmico (RE) e induce la liberación de calcio (Ca^+) al citoplasma, afectando al potencial de la membrana interna mitocondrial, induciendo su permeabilización (Aldabe et al., 1997). Se ha reportado que las proteínas P2B, P2C, P2BC producidas por algunos picornavirus y la proteína E del coronavirus humano SARS-CoV2, son responsables de la remodelación interna de membranas y la formación de cuerpos multivesiculares denominados vioplasmas, que son importantes para la replicación del RNA viral (Barco & Carrasco, 1995; Cao et al., 2021; Suhy et al., 2000). La proteína Vpu del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) es responsable de la disminución del tráfico vesicular de proteínas celulares, siendo este proceso un blanco importante para la replicación del virus (Martin-Serrano & Neil, 2011). Las funciones de las vioporinas son amplias y complejas dentro de la célula. Sin embargo, otra característica de estas proteínas es su función de toxinas y su secreción al medio extracelular como proteínas solubles induciendo efectos importantes en células vecinas; tal es el caso de la vioporina NSP4 de rotavirus considerada la primera enterotoxina viral identificada; la cual forma un canal selectivo facilitando la entrada de Ca^+ a través de la membrana plasmática, provocando una pérdida de agua en el lumen intestinal (Ball et al., 1996; Bugarcic & Taylor, 2006; Hyser et al., 2010). Estudios demostraron que la vioporina NSP4 es secretada por la cara apical de las células epiteliales infectadas, mediante una vía de secreción del tipo no clásica, que pasa por alto al aparato de Golgi. Una vez secretada, NSP4 puede encontrarse en el medio extracelular como una lipoproteína y unirse a glucosaminoglicanos de células vecinas para ejercer su función de vioporina (Díaz et al., 2008; Didsbury et al., 2011; Jourdan et al., 1997).

Otro ejemplo de vioporina es la glicoproteína de envoltura del virus Ébola, denominado péptido delta y se observó que es secretado por las células infectadas

(Sanchez et al., 1998). Aunque carece de una región transmembranal, tiene la capacidad de permeabilizar las membranas plasmáticas de las células no infectadas mediante la formación de homodimeros que son bioquímicamente estables en sueros de personas convalecientes (He et al., 2017).

En los últimos años el estudio de las viroporinas se ha incrementado y gracias a ello se ha podido entender el importante papel que estas tienen en los diferentes pasos de la infección viral, así como en el establecimiento de la citopatogenia, que incluye la evasión de la respuesta inmune. En nuestro grupo de trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de la viroporina LC de FCV y datos preliminares indican que su localización es mayoritariamente citoplasmática, así como en la membrana plasmática, incluyendo la cara externa, a partir de tiempos intermedios de la infección (3 hpi); así mismo se ha sugerido que se encuentra presente en el sobrenadante de células CrFK infectadas, lo que sugiere una posible secreción al medio extracelular.

2) Justificación.

Las viroporinas son proteínas importantes para la replicación, el establecimiento y la diseminación de la infección. Poseen varias características en común como, su toxicidad extrínseca, la formación de oligómeros, su asociación a membranas y en algunos casos, su secreción al medio extracelular actuando como importantes factores de virulencia.

La viroporina LC de FCV fue recientemente caracterizada por nuestro grupo de investigación. Puede asociarse a la cara externa de la membrana plasmática y se ha identificado en sobrenadantes de células infectadas. Asimismo, se ha determinado su capacidad de permeabilizar membranas plasmáticas cuando interactúa exógenamente con células de mamíferos, por lo que se sugiere que pudiera tener un papel de toxina. Este trabajo busca esclarecer si la viroporina LC del FCV puede secretarse al medio extracelular y así comprender un poco más sus funciones relacionadas con la biología de la infección y poder considerarla como un blanco terapéutico.

3) Hipótesis.

La vioporina LC es secretada de células CrFK infectadas con FCV.

4) Objetivo general.

Determinar si la vioporina LC de FCV es secretada al medio extracelular en un contexto de infección.

5) Objetivos específicos.

- 1) Corroborar la presencia de la vioporina LC en el sobrenadante de células CrFK infectadas y determinar si se debe a un proceso de lisis celular o una secreción inducida en la infección por FCV.
- 2) Determinar si la vioporina LC se asocia a vesículas extracelulares.
- 3) Desarrollar un método (ELISA) para la detección y cuantificación de la vioporina LC en el sobrenadante de células infectadas.

6) Materiales y métodos.

6.1) Cultivo celular

La línea celular CrFK (Crandell Rees Feline Kidney) se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivó en medio MEM Advanced (Modified Eagle Medium) (Gibco, Life Technologies) suplementado con 7% de suero fetal bovino (SFB), 2mM de L-glutamina, 5,000 U de penicilina y 5 ug/mL de estreptomicina. Las células se mantienen a 37 °C en presencia de 5% CO₂. Todos los ensayos se realizaron con cultivos con una confluencia de 90%.

6.2) propagación e infección viral

Para la propagación viral, se utilizaron 10 placas de Petri P100 de células CrFK a una confluencia del 85-90% y se infectaron con FCV cepa urbana a una MOI de 0.01 por 24 horas. Una vez pasado el tiempo de infección, las placas se someten a congelación a -80°C durante 1 hora (repetir este proceso 2 veces). Se recogen los sobrenadantes y se centrifugan a 3,000 xg por 15 minutos. Por último, los sobrenadantes se almacenan en tubos Eppendorf de 1.5 mL a -80°C hasta su uso.

El título viral se calculó mediante ensayos de plaqueo, contabilizando el número de placas producidas en diluciones seriadas (en base 10).

Para los ensayos de infección, células CrFK a una confluencia del 85-90%, se infectaron con la cepa urbana de FCV a una multiplicidad de infección (MOI) de 5, en medio MEM sin suero a 37°C durante una hora para la absorción viral, mientras que las células no infectadas (MOCK) solo se incubaron con medio MEM sin suero y sin virus en las mismas condiciones que las infectadas. Pasada la hora de absorción, se retiró el medio de las dos condiciones y se reemplazó por medio MEM sin suero; las células permanecieron a 37°C y se cosecharon a las horas post infección (hpi) indicadas. De igual manera se recolectaron los sobrenadantes.

6.3) Extractos proteicos celulares

Para la obtención de extractos totales, las células CrFK se cultivaron en placas de Petri de 60 mm a una confluencia del 90% y se infectaron o no a una MOI de 5. Transcurrido el tiempo de infección las células se lavaron dos veces con PBS 1X estéril y con la ayuda de un gendarme estéril se despegan las células con movimientos circulares suaves, la suspensión se pasa a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugan 3,500 xg durante 10 minutos. Una vez obtenido el pellet celular se le agregó buffer de lisis, el cual contiene Tris-Cl 10mM, EDTA 1 mM, EGTA 0.5 mM, Tritón x100 1%, sodio deoxycholate 0.1%, SDS 0.1%, NaCl 140 mM a un pH de 8 y se le añadió un inhibidor de proteasas (Complete, free protease inhibitor 1 µL por cada 50 µL de muestra). Las muestras se incubaron a 4°C en agitación por 30 minutos, se centrifugaron a 16,000 xg por 20 minutos y el sobrenadante se guardó a -80 °C hasta su posterior uso.

6.4) Ensayos de Western blot

Las muestras de extractos protéicos se cuantificaron utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher, No de catalogo: 23225); y a 15 microgramos de proteínas celulares se les agregó Leammli 2x, para después hervirlas por 5 minutos y por último se separaron las proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes de acrilamida (SDS-PAGE). Se realizó una transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.22 µm en una cámara de transferencia húmeda y a un voltaje constante. Se bloqueó la membrana por 2hrs en TBS (50mM Tris, 150mM NaCl)-Tween 0.05% v/v con 5% w/v de leche descremada sin grasa y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario correspondiente a la concentración indicada a 4°C durante 12-16hrs en agitación.

La membrana se sometió a 3 lavados de 5min c/u con TBS-Tween 0.05% y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente a la concentración determinada a temperatura ambiente durante 2hrs en agitación.

El revelado se hizo con el kit de quimioluminiscencia SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) en placas fotosensibles

Carestream en las membranas previamente lavadas 3 veces con PBS-Tween durante 3min.

6.5) Precipitación de proteínas totales de sobrenadante.

Los sobrenadantes de las células MOCK infectadas e infectadas con a una MOI de 5 se centrifugaron a 500 xg, se descartó el pellet y se centrifugan a 2,000 xg por 30 minutos, el boton se descarta y se da una última centrifugación a 20,000 xg por 30 minutos. Y por ultimo se pasan los sobrenadantes por filtros de 0.22 µm.

En tubos eppendorf de 1.5 mL se agregan 500 µL de sobrenadante, 500 µL de metanol y 125 µL de cloroformo. Se mezclan con la ayuda de un vortex hasta que se torne de color blanco. Las muestras se centrifugan a 13, 000 xg por 5 minutos. Se retira cuidadosamente la fase acuosa con una pipeta, evitando llevarse la capa blanca intermedia que corresponde al precipitado de las proteínas. Se agregan 500 µL de metanol y se mezclan con ayuda de un vortex hasta que la pastilla se disuelve. Por último, se centrifugan las muestras a 13, 000 xg por 5 minutos, el sobrenadante de desecha y el botón se resuspende en buffer de lisis con inhibidores de proteasas (Jakobs et al., 2013).

6.6) Ensayos de SYTOX Green™

El tinte fluorescente SYTOX Green™ (Thermo Fisher, USA, No. de catalogo: S7020) se une a ácidos nucleicos en células con membrana plasmática comprometida. En placas de 96 pozos se sembraron células CrFK, se crecieron al 80-90% de confluencia y se infectaron a una MOI de 0.1 y 5. Se incluyó una condición de infección MOCK. Después de la hora de absorción la placa se incubó con el reactivo SYTOX Green™ por 10 minutos a una concentración de 5 µM diluido en medio de cultivo (MEM sin suero), siguiendo las sugerencias del fabricante. Las mediciones se realizaron en un fluorómetro (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher, USA) en una cinética de infección (1, 3, 5, 7 y 9 h.p.i.). Las lecturas se compararon con el tiempo 0 por cada pozo para obtener el valor relativo de fluorescencia.

6.7) Viabilidad celular mediante MTT

El ensayo se basa en una reducción del 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima succinato deshidrogenasa. La reducción del reactivo da como resultado a un compuesto de color morado (formazán), permitiendo determinar el estado metabólico celular. la cantidad de células viables es proporcional al formazán producido. Para este ensayo, se sembraron células CrFK en cajas de 96 pozos y se dejaron crecer a una confluencia del 85-90%. Se infectaron a una MOI de 5 a diferentes tiempos (3, 5, 7 y 9 h.p.i), posteriormente se le agregaron 10 μ L del reactivo MTT (Sigma-Aldrich, No. de catalogo 88417) a una concentración de 12 mM y se dejaron incubar 2 horas a 37 °C y protegido de la luz. Posteriormente, las células infectadas MOCK e infectadas a diferentes tiempos, se les agrega 100 μ L de la solución de solubilización (SDS al 10% v/v, HCl 0.01 N) y se deja incubando 12 horas a 37 °C y protegido de la luz. Las placas se leen a 570 nm en un espectrofotómetro. La comparación se hace utilizando a la condición MOCK como base al 100%.

6.8) Centrifugación diferencial para la obtención de vesículas extracelulares

En frascos de cultivo (175 cm²) se sembraron células CrFK y se dejaron crecer a una confluencia del 85-90% se infectaron a una MOI de 0.1 por 24 horas (Mizenko et al., 2022). Los cultivos correspondientes a la infección MOCK se trataron de la misma manera, utilizando medio de cultivo. Pasado el tiempo de infección, se recogieron los sobrenadantes.

Los sobrenadantes se centrifugaron a 500 xg por 5 minutos, pasando el precipitado a otro tubo y guardando el sedimento (Sedimento 1); el precipitado se centrifuga a 2,000 xg por 30 minutos (Sedimento 2). La separación de las vesículas extracelulares se realizó mediante una centrifugación a 20,000 xg por 60 minutos, obteniendo el sedimento 3 (VEG) en el cual se aíslan vesículas extracelulares grandes (VEG). Por último, se realizó una ultracentrifugación utilizando el rotor Beckman 55.2 Ti a 37,000 RPM por 80 minutos, lo que equivale a 112,773 xg. Se utilizó el servidor <https://biomodel.uah.es> para realizar los cálculos. Obteniendo el sedimento 4 que corresponde a vesículas extracelulares pequeñas. Debido a la ultra

centrifugación del último paso, se obtuvo una fracción de proteínas solubles en teoría libre de vesículas extracelulares, que servirá para otros experimentos.

En la figura 4 se muestra un esquema general de la centrifugación diferencial y el contenido teórico de cada sedimento obtenido (Modificado de Baez-Navarro et al., 2022).

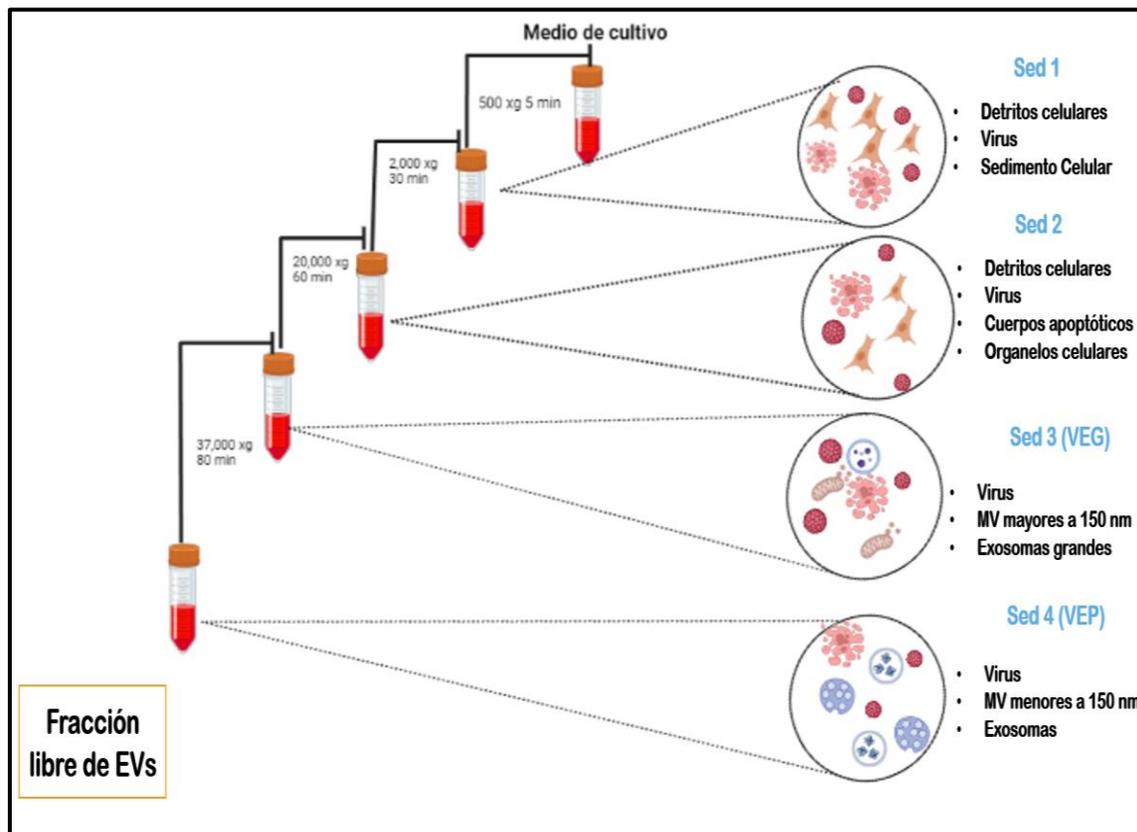
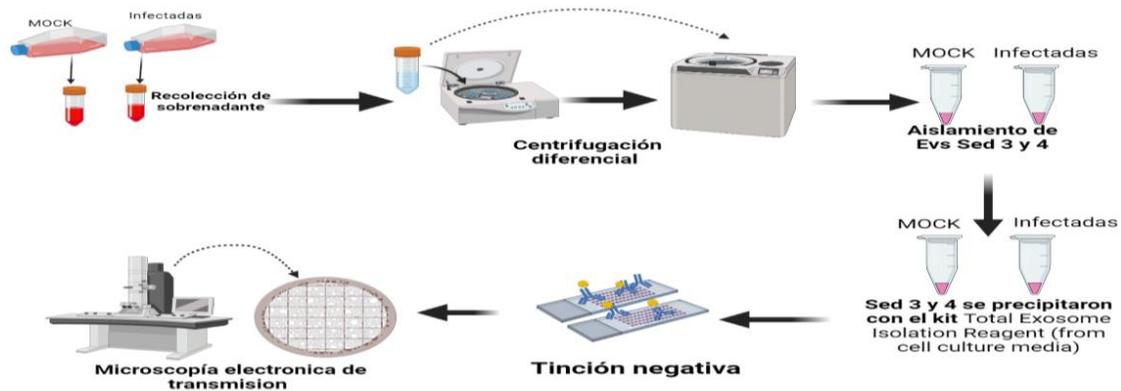


Figura 4) Aislamiento de vesículas extracelulares mediante centrifugación diferencial. El sobrenadante de los cultivos infectados y MOCK se centrifugaron a 500 xg por 5 minutos (Sed 1), posteriormente a 2,000 xg por 30 minutos (Sed 2). Para obtener vesículas grandes se centrifugaron las muestras a 20,000 xg por 60 minutos (Sed 4 VEG) y por último a 112,773 xg por 80 minutos para la obtención de vesículas extracelulares pequeñas (Sed 4 VEP) y una fracción libre de vesículas extracelulares. En la condición MOCK no se aislaron virus en ninguna fracción. Sed: Sedimento, VEG: Vesículas extracelulares grandes, VEP: vesículas extracelulares pequeñas.

6.9) Purificación de vesículas extracelulares para microscopía electrónica de transmisión

Se cultivaron células CrFK en frascos T175 y se infectaron con FCV cepa Urbana a una MOI de 0.1 y la condición MOCK. Se recolectaron los sobrenadantes y se centrifugaron como se describió anteriormente (procedimiento 7.6). Se tomó el sedimento 4 (VEP) y se resuspendió en 500 μ L de PBS estéril. Se les adicionó 250 μ L del reactivo Total Exosome Isolation Reagent (from cell culture media) (Thermo Fisher, No. de catalogo 4478359), el cual es un reactivo que al unir las moléculas de agua, provoca que las moléculas menos solubles como exosomas puedan salir de la solución. Se dejó precipitando toda la noche y la muestra se centrifuga a 10,000 xg por 60 minutos, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras obtenidas en este último paso se fijaron en rejillas de cobre y se tiñeron negativamente con acetato de uranilo para su observación en un microscopio electrónico de transmisión (Figura 5).



Created in BioRender.com 

Figura 5) Purificación de vesículas extracelulares grandes y pequeñas para su análisis por microscopía electrónica de transmisión. El sedimento 4 se resuspendió en 500 μ L de PBS estéril y se les agregó el kit Total Exosome Isolation Reagent (from cell culture media) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se fijaron las muestras en rejillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo.

6.10) Transformación de bacterias quimiocompetentes por choque térmico

Bacterias *E. coli* BL-21 quimiocompetentes se incubaron en hielo por 10 minutos con 50-100 ng de DNA plasmídico (pRSETA-LC). Posteriormente se someten a un choque de calor por 60 segundos a 42 °C, inmediatamente se incubaron por 2 minutos a 4 °C. Se transfirieron a tubos de 1.5 mL adicionados con medio LB. Por ultimo se hicieron cultivos de 5 mL con medio LB adicionado con antibióticos.

6.11) Inducción de expresión por IPTG

En medio LB enriquecido con antibióticos se inocularon bacterias transformadas y una vez alcanzada la densidad óptica deseada (OD 600 0.4-0.6), se agregó isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG, Thermo Fisher, USA) para la expresión génica de la proteína recombinante Histag-LC a una concentración de 1mM.

6.12) Enriquecimiento de cuerpos de inclusión

Cultivos de bacterianos de 50 mL de 6 horas de inducción se centrifugaron en tubos de 50 mL a 300 xg; el sobrenadante se descarta y el botón se lava con PBS. Se resuspenden las pastillas en 1 mL de PBS, se juntan los botones de bacterias en un tubo de 15 mL. Se agrega 1 mg de lisozima y 10 μ L de un coctel de inhibidores de proteasas y se incuban en hielo por 30 minutos. Las muestras se sonicar con 10 pulsos de 10 segundos cada uno con 100% de amplitud. La muestra sonicada se centrifuga a 14,800 RPM a 4 °C por 20 minutos, el botón se resuspendió para próximos experimentos.

6.13) ELISA tipo sandwich para la detección de la viroporina LC en sobrenadantes

Placas de ELISA (Thermo Fisher, EUA) se sensibilizaron con sueros hiperinmunes anti LC de ratón, producidos en nuestro laboratorio (Peñaflor-Téllez., 2023 datos no publicados) a una dilución de 1:500 en buffer de carbonatos (NaHCO₃, Na₂CO₃ 0.1 M) durante toda la noche. Se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBS-Tween al 0.5% y se les agregó una solución de bloqueo (leche descremada al 5%) por 2 horas y se lavaron 3 veces con PBS-Tween.

Sobrenadantes de células infectadas a diferentes tiempos (1, 3, 5, 7 y 9 h.p.i.) e infectadas MOCK se recogieron y se les realizó una precipitación de proteínas totales (método 7.5). El precipitado de proteínas se resuspendió en 150 µL de PBS (por cada condición) y se agregaron 50 µL a cada pozo. La placa se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, se retira la solución y se lavan los pozos 3 veces. Se agregó el anticuerpo de captura anti LC de conejo a una dilución de 1:100 en PBS-Tween al 0.5% se dejó incubar por 2 horas y se lavaron tres veces con PBS-Tween. Se agregó un anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa de rabano 1:2,000 por 1 hora. Se retiró la solución y se agregaron 50 µL del sustrato 2,2 azino bis (3-ethylbenzothiazoline 6 sulfuric acid) y la absorbancia se evaluó a 415 nm en un espectrofotómetro. (Protocolo modificado de Hornbeck, 2015.) En la figura 6 se esquematiza el diseño de la técnica.

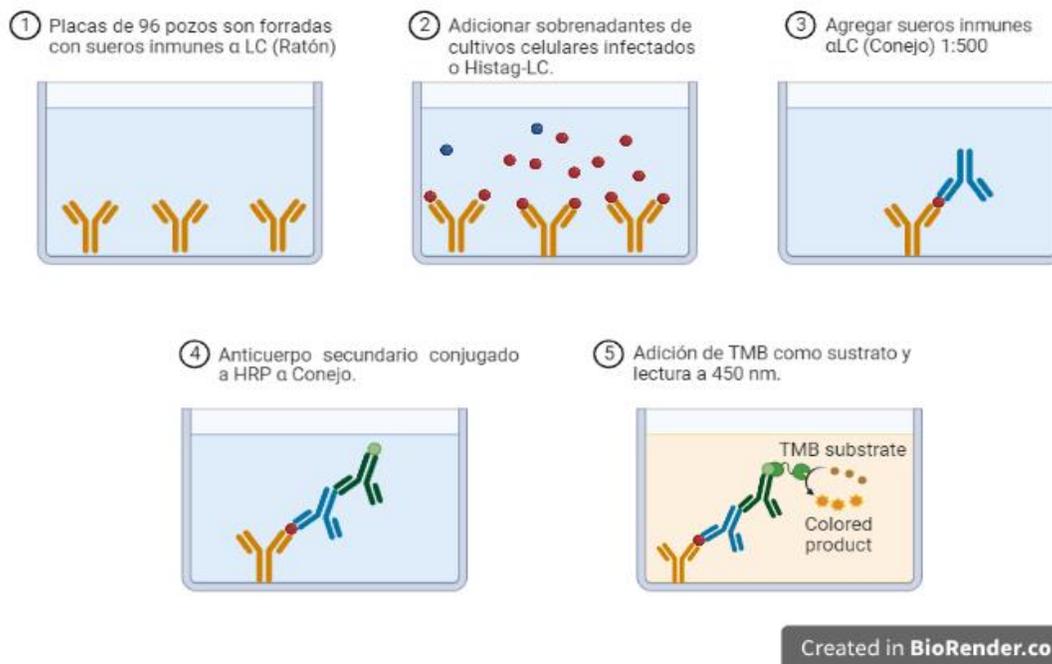


Figura 6) Esquema de la técnica ELISA para la detección de LC en sobrenadantes de células infectadas con FCV. (Modificado de Hornbeck, 2015).

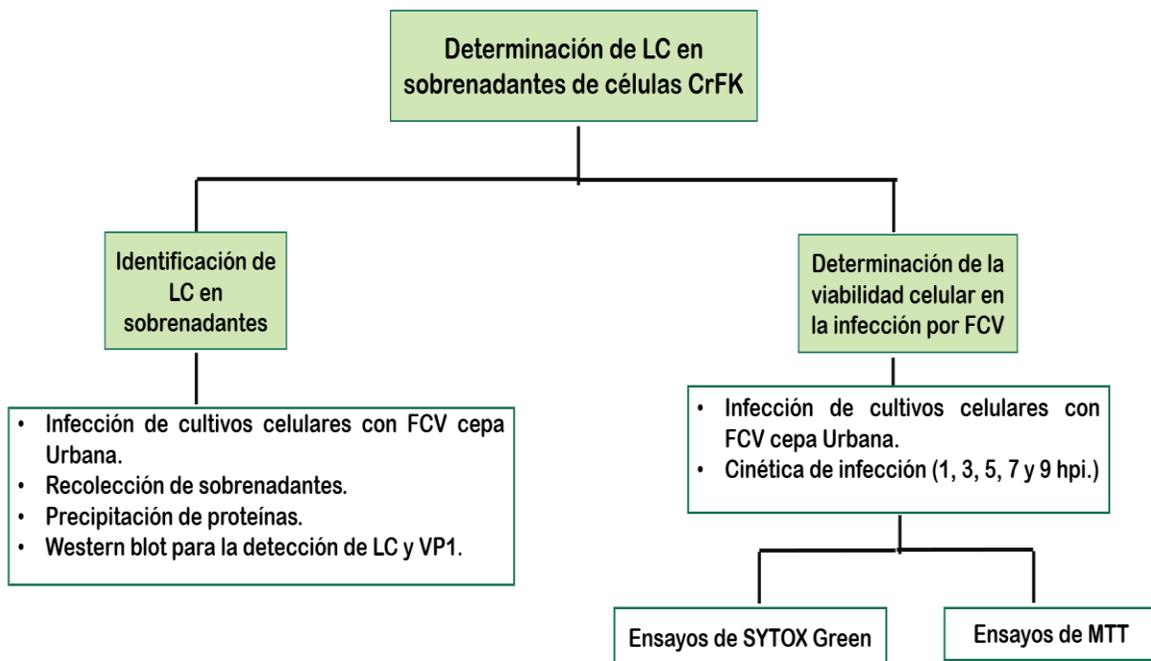
6.14) Análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad Prism 9.0 para la elaboración de las gráficas y el análisis estadístico. Los valores graficados se presentan como el promedio \pm la desviación estándar. Los valores se analizaron utilizando las pruebas de t Student y ANOVA de una vía, según lo indicado. Los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7.0) Diagrama de trabajo

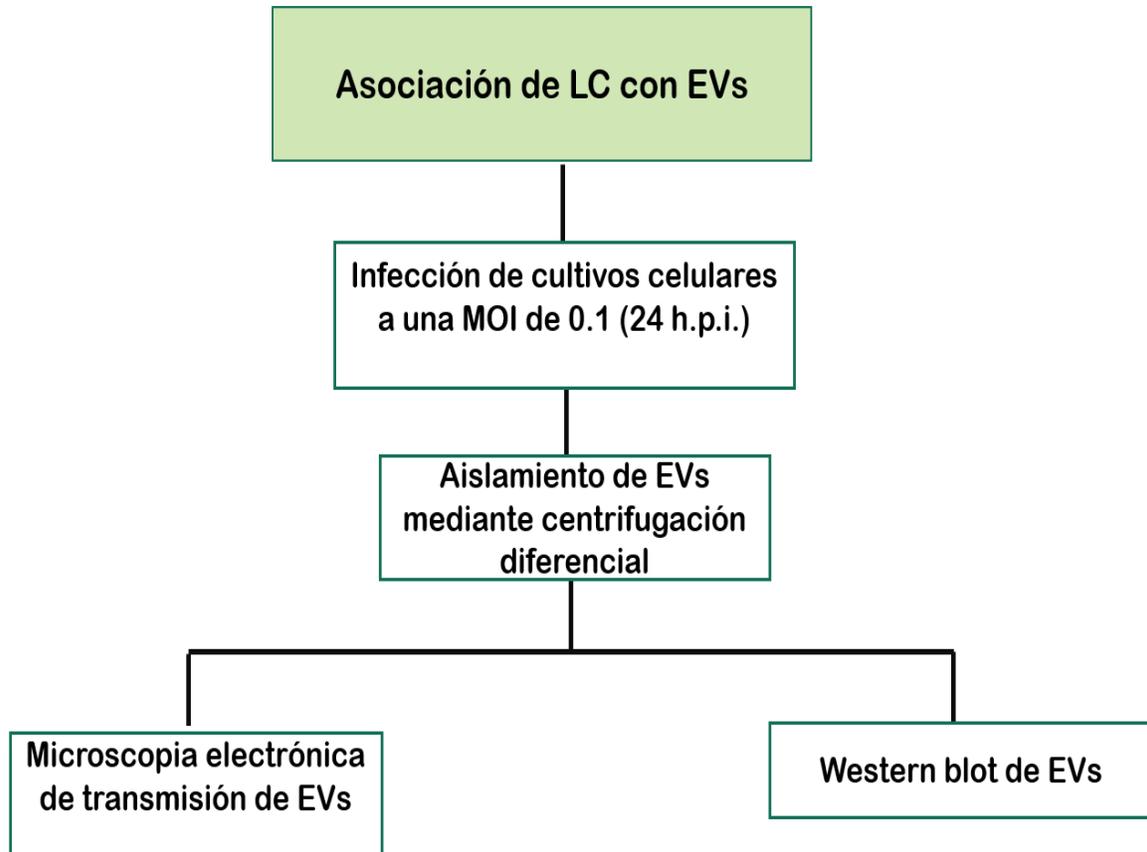
Para cumplir con los objetivos de este proyecto de investigación, se seguirá el siguiente diagrama de trabajo.

7.1) Objetivo 1. Corroborar la presencia de la viroporina LC en el sobrenadante de células CrFK infectadas y determinar si se debe a un proceso de lisis celular o una secreción inducida en la infección por FCV.



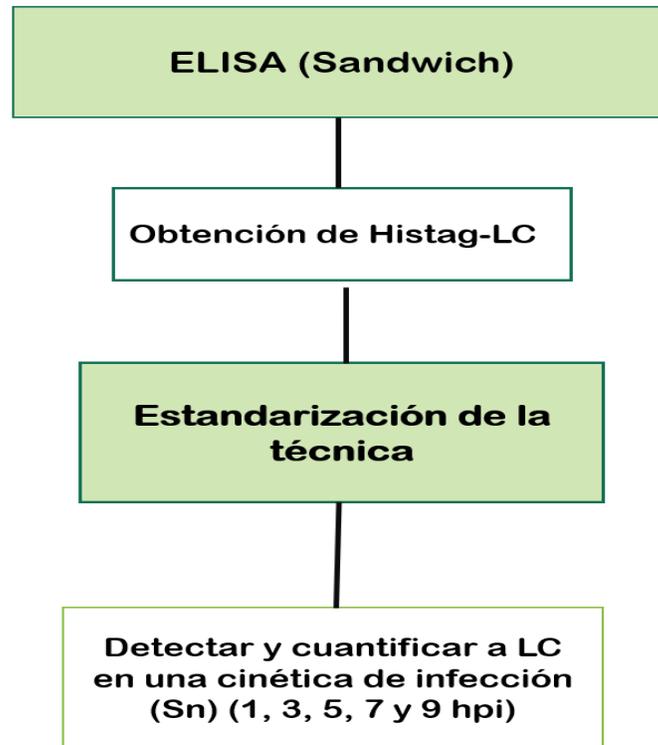
Cultivos de células CrFK se infectan con FCV cepa Urbana a una Moi de 5 en una cinética de infección (1, 3, 5, 7 Y 9 hpi). Una vez pasado el tiempo de infección se recolectan los sobrenadantes y las células se procesan para la extracción de proteínas totales y la determinación de la viroporina LC y la proteína estructural VP1 por medio de Western blot. Los sobrenadantes se tratan por medio de una centrifugación diferencial para retirar los restos celulares y se realiza la precipitación de proteínas mediante el método metanol-cloroformo. Las muestras se analizan por western blot. Los ensayos de viabilidad celular se realizan en células CrFK infectadas y no infectadas. Se utiliza el reactivo Sytox Green para evaluar la integridad de la membrana plasmática y ensayos de MTT para evaluar el estado metabólico de las células en la infección por FCV.

7.2) Objetivo 2 Determinar si la viroporina LC está presente en vesículas extracelulares.



Para desarrollar este objetivo partimos de cultivos de células CrFK en condiciones MOCK o infectadas a una MOI de 0.1 por 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se les realiza una centrifugación diferencial para la obtención de 4 sedimentos. En el sedimento 1 se obtienen células muertas y detritos celulares; en el sedimento 2 organelos completos celulares, cuerpos apoptóticos y microvesículas grandes en el sedimento 3 microvesículas pequeñas y cuerpos apoptóticos; en el sedimento 4 microvesículas pequeñas, exosomas y virus. Una vez centrifugados los sobrenadantes, nos queda una fracción libre de vesículas (fracción soluble). Las muestras vesiculares se analizaron por microscopía electrónica de transmisión y mediante western blot.

8.3) Objetivo 3 Desarrollar un método (ELISA) para la detección y cuantificación de la viroporina LC en el sobrenadante de células infectadas.



Debido a la falta de un método para la detección y cuantificación específica de LC, nos propusimos desarrollar una ELISA tipo sándwich. Para ello obtuvimos a la proteína recombinante Histag-LC y realizamos la estandarización de la técnica. Se probaron varias condiciones usando la proteína recombinante Histag-LC como control positivo y se usó a BSA como control negativo. Se comprobó la especificidad y sensibilidad del método y por último se utilizó la técnica para la determinar la concentración de la viroporina LC en el sobrenadante de células infectadas.

8.0) Resultados

8.1) Cinética de expresión del ORF 2 de FCV en la replicación viral.

El ORF2 se traduce como un precursor LC-VP1 que posteriormente es escindido para la producción de la proteína no estructural LC y la proteína estructural VP1 madura (Sosnovtsev et al., 2005). En nuestro laboratorio se ha observado que la expresión de estas proteínas a una MOI de 5 ocurre a partir de las 3 horas post infección. Para corroborar estos datos, células CrFK se crecieron a una confluencia del 80-90% en condiciones estándar y se infectaron a una MOI de 5 con FCV de la cepa Urbana y a las 1, 3, 5, 7 y 9 horas post infección (h.p.i.). Se cosecharon las células y procesaron para la obtención de extractos de proteínas y su análisis por medio de western blot. Se utilizó un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente a la proteína VP1 (Santa Cruz, EUA) de FCV. Para la detección de LC se utilizaron sueros hiperinmunes anti-LC de ratón y como control de carga se usó a β -actina (Santa Cruz, EUA).

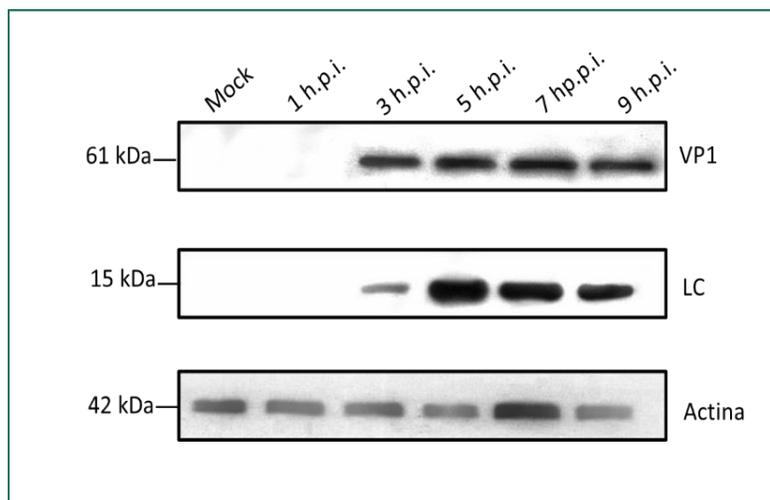


Figura 7) Tiempos de expresión de las proteínas VP1 y LC durante la infección por FCV. A) Extractos proteicos de células infectadas en una cinética de infección (1,3, 5, 7 y 9 h.p.i.) con el FCV a una MOI de 5 se separaron por SDS-PAGE y la presencia de LC y VP1 se analizó por western blot.

En la figura 7 se observa que a partir de las 3hpi es posible detectar tanto a la proteína LC como a la proteína VP1, pero la mayor expresión ocurre entre las 5 y las 9 hpi en células CrFK.

8.2 La viroporina LC se encuentra en sobrenadantes de células CrFK infectadas con FCV.

Se sabe que la localización de la viroporina LC en las células infectadas es mayoritariamente citoplasmática. Sin embargo, resultados recientes de nuestro grupo de trabajo mostraron que también está presente en la membrana plasmática (Peñaflor-Tellez., 2023 Datos no publicados), por lo que fue interesante evaluar si esta se encontraba en el sobrenadante (SN) de las células infectadas. Para esto, cultivos celulares se infectaron y se recogieron los sobrenadantes a las 1, 3, 5, 7 y 9 h.p.i. Posteriormente se centrifugaron y filtraron para remover células muertas y detritos celulares (procedimiento 7.5). Se precipitaron las proteínas totales del SN y se analizaron mediante western blot.

Se observó que a partir de las 5 y hasta las 9 h.p.i. es posible detectar a la viroporina LC en los SN de células infectadas (Figura 8), lo cual concuerda con la máxima expresión de VP1, que detectamos a apartir de las 5hpi (Figura 7). Estos resultados nos dieron la pauta para evaluar si la viroporina LC se podía secretar al medio extracelular en un contexto de infección. Hasta la fecha no hay estudios que indiquen que alguna proteína viral pueda secretarse en la infección por FCV.

8.3) La presencia de la proteína LC del FCV en el sobrenadante no es producto de una permeabilización de la membrana plasmática durante la infección.

La viroporina LC se puede detectar en el sobrenadante de células infectadas desde las 5 horas post infección, por lo que es posible que ello se deba a procesos de lisis celular, debido a la inducción de la apoptosis en la infección por FCV (Barrera-Vázquez et al., 2019; Sosnovtsev et al., 2003). Es por eso que consideramos necesario evaluar la integridad de la membrana plasmática en células CrFK durante la infección por FCV. Para esto, monocapas de células CrFK se sembraron en placas de 96 pozos y se infectaron o no a diferentes tiempos (1, 3, 5, 7 y 9 hp.i.) a una MOI de 5 y 0.1 para observar las diferencias y se evaluó la integridad de la membrana plasmática en primera instancia por microscopía de epifluorescencia utilizando el reactivo SYTOX™ Green (Thermo Fisher Scientific, EUA) el cual es un tinte fluorescente que puede unirse a ácidos nucleicos únicamente en células con membranas plasmáticas dañadas o comprometidas, por lo que se considera como un buen indicador de la integridad de la membrana plasmática (He et al., 2017) (Figura 9).

Las imágenes de microscopía revelan un efecto citopático típico del progreso de la infección, con redondeamiento celular y ruptura de la monocapa a partir de las 5 h.p.i. a una MOI de 5, mientras que a una MOI de 0.1 no logramos observar este efecto en ninguno de los tiempos analizados. En los ensayos de Sytox Green, tampoco observamos emisión de fluorescencia en alguna de las condiciones probadas, sugiriendo que no se presenta daño celular.

Para corroborar que las membranas celulares se encuentran integras como lo sugieren los ensayos anteriores, se realizaron mediciones de la intensidad de fluorescencia del Sytox Green en un fluorómetro (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher, EUA) el cual mide la fluorescencia total de cada pozo (Figura 10).

Se pudo observar que en la condición de infección a MOI de 0.1 y MOCK, la emisión de fluorescencia fue semejante, sugiriendo que en estas condiciones de infección no se permeabiliza la membrana celular.

Por otro lado, comparando la condición MOCK y la de infección a una MOI de 5, se observó una tendencia a la alza en la emisión de la fluorescencia a partir de las 7 h.p.i. (Figura 10), esta diferencia tampoco fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$), confirmando que la infección por FCV a MOI de 0.1 y 5, no compromete a la membrana plasmática, reforzando la hipótesis que la viroporina LC pudiera estar secretándose en la infección por FCV.

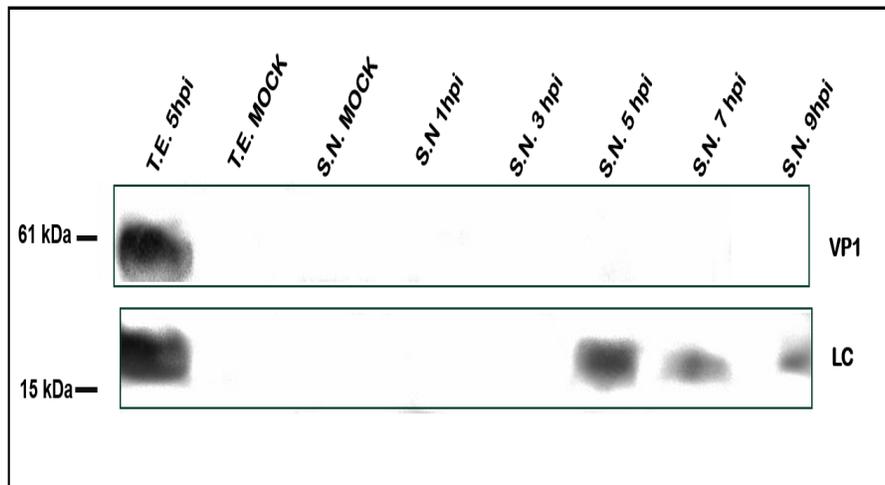
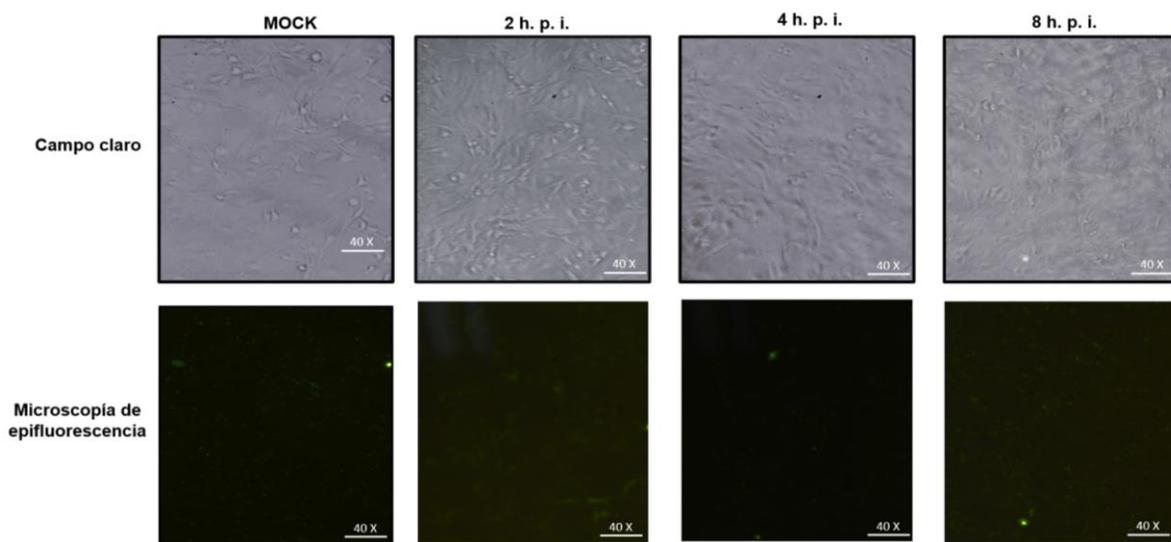


Figura 8) Identificación de la viroporina LC en sobrenadantes de células CrFK infectadas con FCV. A) Sobrenadantes de cultivos celulares infectados y no infectados (MOCK) se analizaron mediante western blot para la detección de la proteína estructural VP1 y la viroporina LC de FCV. Se identifica a la virporina LC a partir de las 5 h.p.i. imagen representativa de 4 experimentos independientes por western blot.

A) Celulas CrFK infectadas con FCV a una MOI de 0.1 incubadas con SYTOX™ Green.



B) Celulas CrFK infectadas con FCV a una MOI de 5 incubadas con SYTOX™ Green.

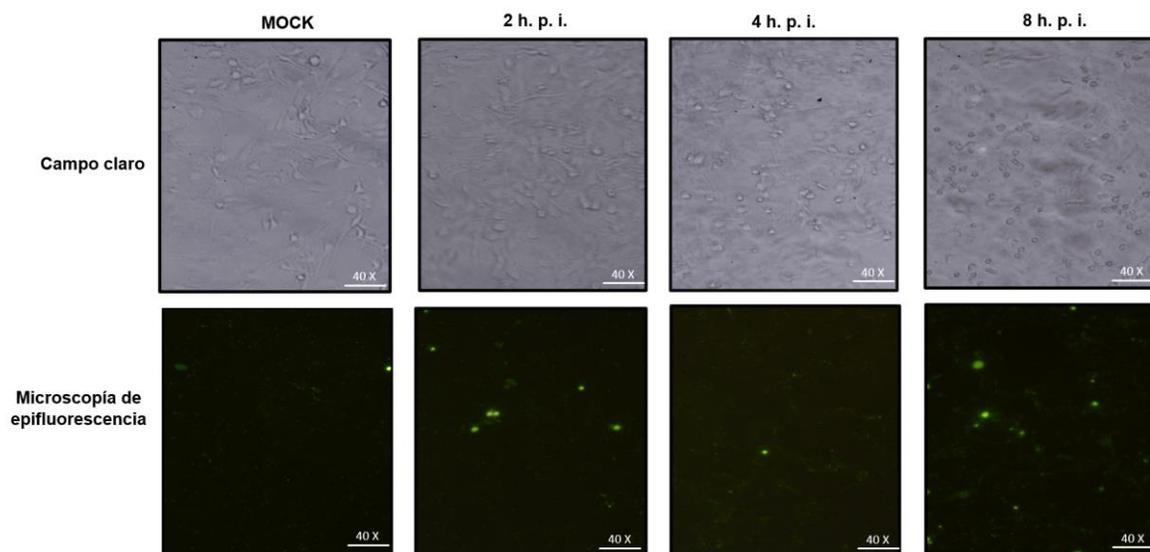


Figura 9) Evaluación de la integridad de las monocapas de células CrFK infectadas con FCV a MOI de 0.1 y 5. Monocapas de células CrFK se infectaron a una MOI de 0.1 (A) y de 5 (B) y la integridad de la membrana plasmática se evaluó mediante epifluorescencia por ensayos de SYTOX™ Green. La progresión en el efecto citopático en los diferentes tiempos post infección se observa en las imágenes de campo claro (40 x).

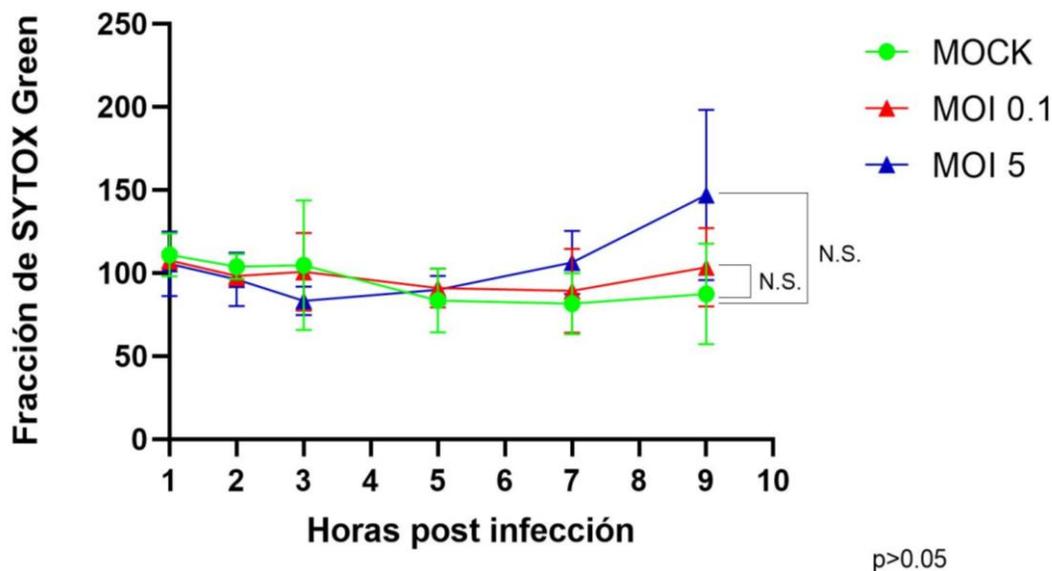


Figura 10) Evaluación de la integridad de la membrana plasmática de células CrFK en la infección por FCV mediante emisión de fluorescencia por Sytox Green. Células CrFK no infectadas (línea verde), infectadas con FCV a una MOI de 0.1 (línea roja) o MOI de 5 (línea azul) a 1, 3, 5, 7 y 9 h se incubaron con sytox Green por 15 min y la fluorescencia total de cada pozo se determinó utilizando el equipo Fluoroskan Ascent FL,(Thermo Fisher, EUA) Las medias se obtuvieron de 3 experimentos independientes por triplicado. Se utilizó la prueba t Student para la comparación de los grupos. Los valores de $p > 0.05$ se calcularon usando el software Gradhpad Prism 9.0.

8.4) Viabilidad celular de células CrFK en la infección por FCV.

Para determinar la viabilidad celular de monocapas de células CrFK infectadas con FCV, se realizaron ensayos de MTT en las células MOCK e infectadas con FCV a una MOI de 5 a diferentes tiempos post infección (3, 5, 7 y 9 h.p.i.). Se observó que la infección induce cambios leves en el estado metabólico celular que no resultaron estadísticamente significativos (Figura 11). Estos resultados indican que la presencia de LC en el sobrenadante a los tiempos post infección evaluados no se relacionan con la disminución en la viabilidad celular.

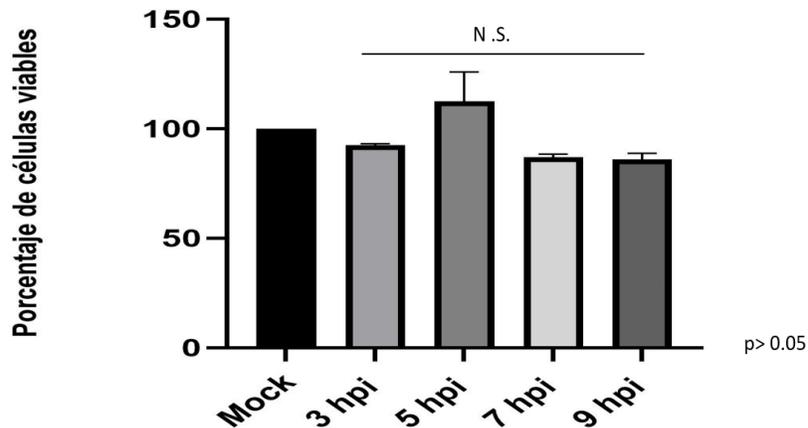


Figura 11) Viabilidad celular en la infección por FCV. Monocapas de células CrFK no infectadas e infectadas a una MOI de 5 por 3, 5, 7 y 9 h.p.i. y fueron sometidas a ensayos de viabilidad celular utilizando MTT. Las medias se obtuvieron de 2 experimentos independientes por triplicado. Se utilizó la prueba ANOVA para la comparación de los grupos. Los valores de $p > 0.05$ se calcularon usando el software Gradhpad Prism 9.0.

8.5) La viroporina LC se asocia a vesículas extracelulares.

Los datos obtenidos hasta ahora indican que LC puede secretarse al medio extracelular. Asimismo, resultados de nuestro laboratorio indican que LC está presente en la membrana plasmática (Peñaflor-Tellez, datos no publicados) y debido a que la biogénesis de diferentes tipos de vesículas extracelulares se relaciona con la membrana plasmática, fue de nuestro interés determinar si LC pudiera asociarse a algún tipo de vesículas extracelulares (EVs).

En primera instancia, se empleó un método para el aislamiento de EVs por su tamaño, basado en centrifugación diferencial en células MOCK e infectadas. Se obtuvieron 4 sedimentos; en los sedimentos 1 y 2 se esperaban aislar células muertas, organelos completos y cuerpos apoptóticos grandes. En los sedimentos 3 (VEG) y 4 (VEP) se esperaba aislar microvesículas, exosomas y virus.

Para corroborar la eficacia del aislamiento de EVs, al sedimento 4 (VEP) se le dio un tratamiento extra con el reactivo Total Exosome Isolation Reagent (from cell

culture media) (Thermo Fisher, USA. No. de catalogo: 4478359) y se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión (procedimiento 7.8).

En las micrografías se observan estructuras membranas de 70-190 nm de diámetro tanto en células MOCK infectada como infectadas (Figuras 12 y 13); A diferencia del sedimento de las células MOCK infectadas, el proveniente de las células infectadas presenta estructuras libres de 40 nm (probablemente viriones) (Figura 12 D), y agregados de estructuras de 40 nm que se asemejan a viriones de FCV (Figura 12B y 12C) (Aboubakr et al., 2018).

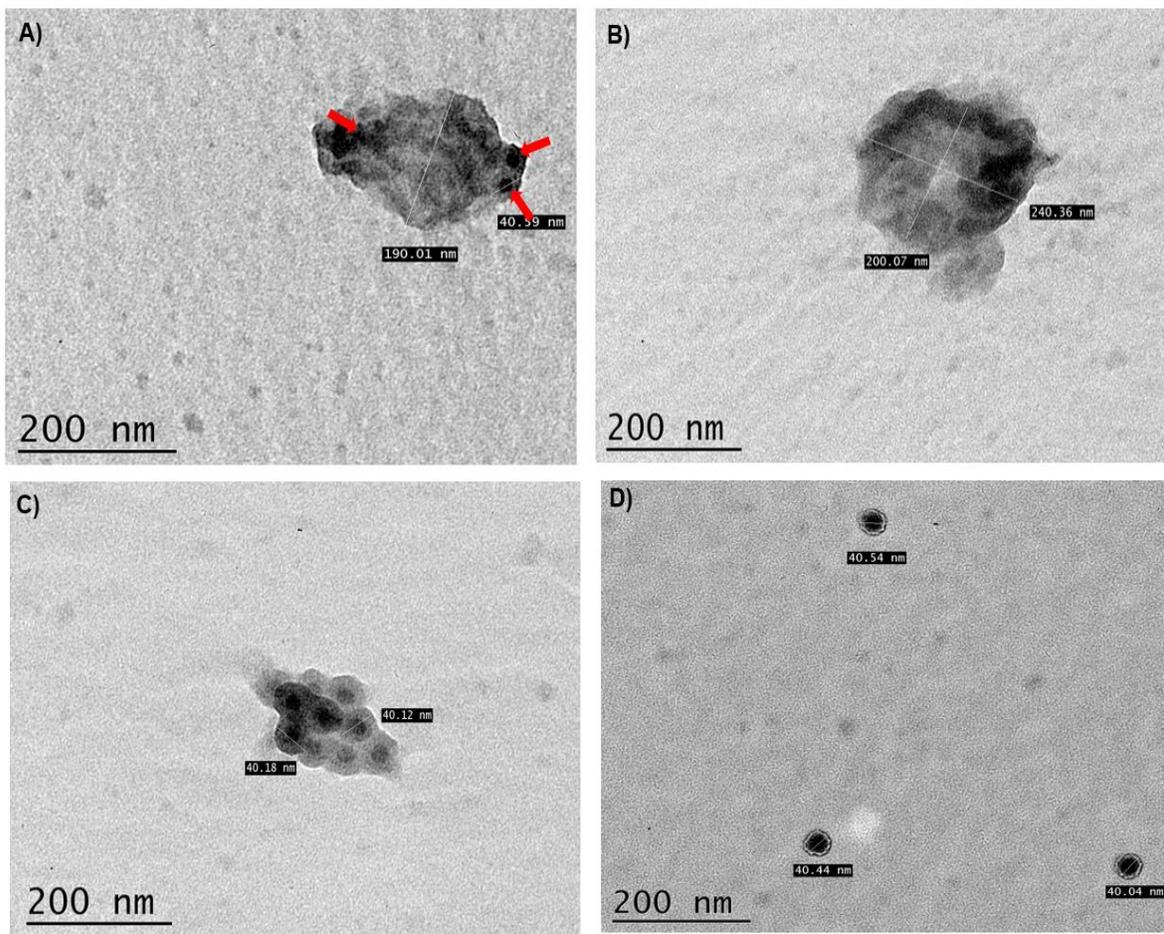


Figura 12) Microscopía electrónica de transmisión de EVs (VEP) aisladas de células CrFK infectadas con FCV. A) y B) Se observan estructuras membranas que se asemejan a EVs y estructuras de 40 nm, similares a viriones, los cuales se ven asociados a cuerpos membranosos. C) Agregados de estructuras de 40 nm de diámetro, semejantes

a viriones de FCV. D) Estructuras de 40 nm de diámetro dispersas en el campo observado, semejantes a viriones de FCV.

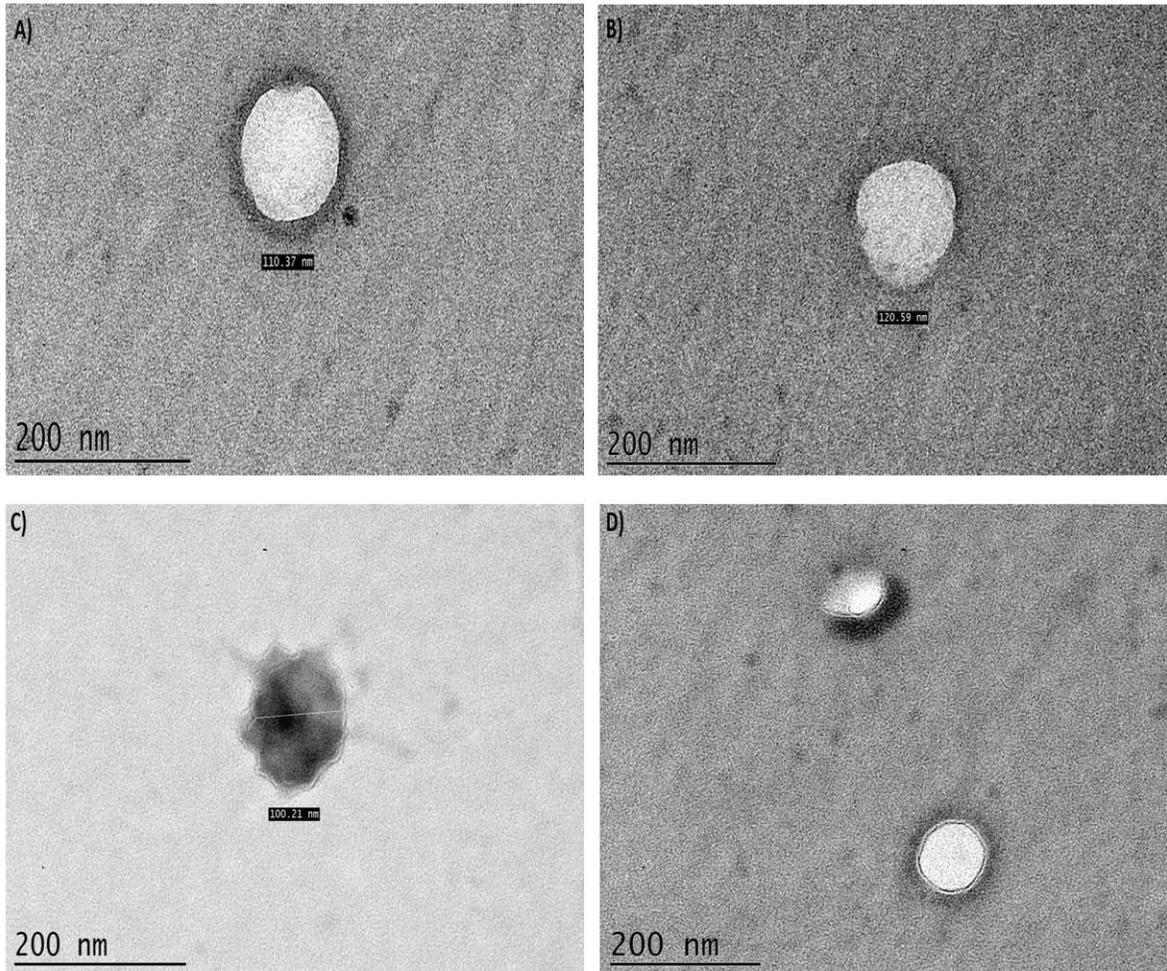


Figura 13) Microscopía electrónica de transmisión de EVs aisladas de células CrFK no infectadas (MOCK) del sedimento 4 (VEP). Se pueden apreciar estructuras semejantes a cuerpos membranosos de 100-120 nm de diámetro.

Una vez corroborado que la centrifugación diferencial fue eficiente para el aislamiento de EVs, a los sedimentos se les realizó una extracción de proteínas totales y la presencia de LC se analizó mediante electroforesis en geles de acrilamida al 15% y western blot. Para la detección de la viroporina LC se utilizaron sueros hiperinmunes anti LC producidos en ratón y se utilizó un anticuerpo que reconoce específicamente a la proteína Alix (Aviva Systems Biology).

Los análisis por western blot mostraron que el marcador de exosomas Alix está presente en el sedimento 1, 2 y 3 (VEG) en las condiciones MOCK e infectadas, aunque en menor proporción en las condiciones MOCK. En cuanto a la detección de LC, en la condición MOCK no se obtuvo señal como era de esperarse; sin embargo, interesantemente se detectó a LC en todos los sedimentos analizados: 1, 2, 3 (VEG) y 4 (VEP). Estos resultados indican que la viroporina LC se asocia a EVs pequeñas y grandes (microvesículas y exosomas) (Figura 9).

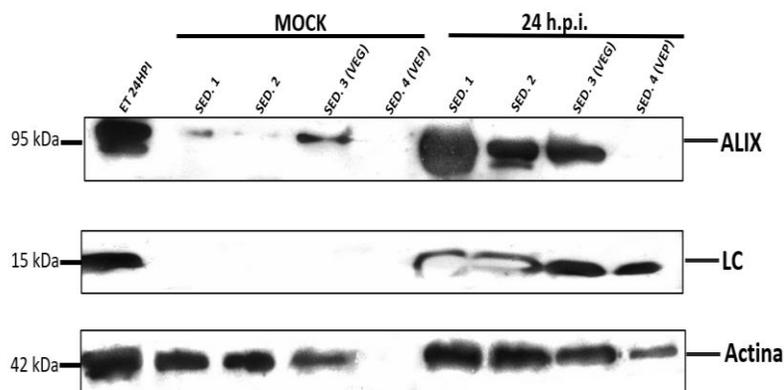


Figura 14) Inmunodetección de la viroporina LC y Alix en fracciones vesiculares purificadas de cultivos de células CrFK infectadas y no infectadas (MOCK). Las fracciones vesiculares obtenidas por centrifugación diferencial fueron procesadas para la extracción de proteínas totales. Se pudo detectar al marcador de exosomas Alix (96 kDa) en las fracciones 1, 2 y 3 (VEG) en ambas condiciones. La viroporina LC de FCV se pudo detectar en la condición de infección a MOI de 0.1 en las 4 fracciones vesiculares. Imagen representativa de 2 experimentos independientes realizados de western blot. ET: Extractos totales, SED 1: Sedimento 1, SED.2: Sedimento 2, SED 3 (VEG): Sedimento 3

correspondiente a EVs grandes y SED 4 (VEP): Sedimento 4 correspondiente a EVs pequeñas.

8.6) La viroporina LC se encuentra en la fracción soluble y forma oligómeros en condiciones no reductoras.

Debido a que en la metodología empleada para la separación de fracciones membranosas obteníamos una fracción soluble, fue interesante evaluar si la viroporina LC se encontraba también como una proteína soluble. Para ello, se realizó una precipitación de proteínas (método 7.5) de la fracción soluble y la presencia de LC en el precipitado se analizó por western blot. Interesantemente, se pudo detectar a la viroporina LC, indicando que también puede estar como una proteína soluble en el sobrenadante de células infectadas (Figura 15 A).

En un estudio realizado en nuestro laboratorio se confirmó que la proteína recombinante Histag-LC puede formar oligómeros mediante puentes disulfuro en ausencia de un agente reductor (Peñaflor-Téllez et al., 2022). Debido a que la oligomerización es crucial para que las viroporinas puedan ejercer su función (Nieva et al., 2012), estudiamos el estado de oligomerización de LC en el medio extracelular. Para esto, se analizaron 20 μ L del precipitado de proteínas de la fracción soluble de cultivos celulares infectados mediante western blot, en condiciones no reductoras (sin β ME). En estos ensayos detectamos la forma monomérica de 14 kDa y una forma oligomérica de aproximadamente 28 kDa en el medio extracelular en un contexto de infección (Figura 15 B).

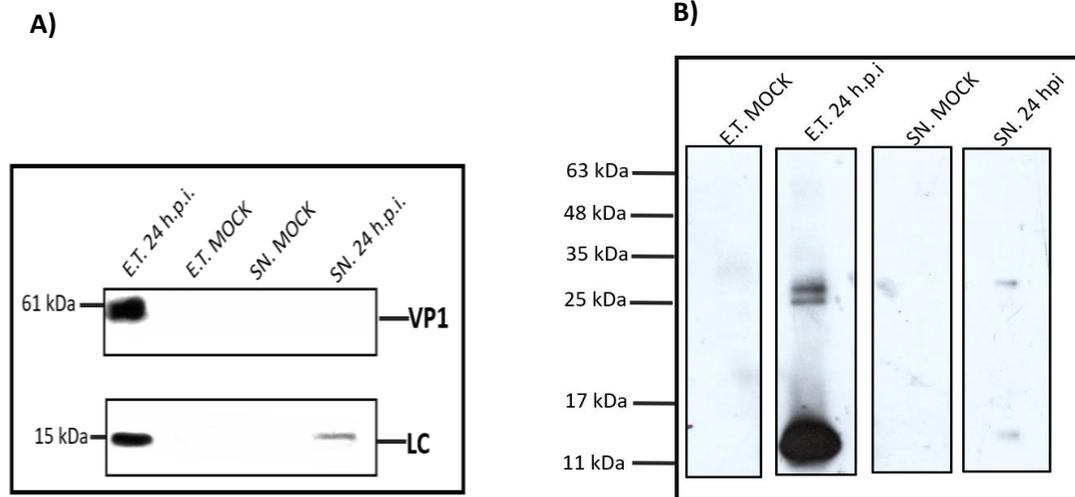


Figura 15) Inmunodetección de la viroporina LC en la fracción soluble. La fracción soluble, obtenida de la centrifugación diferencial se utilizó para la precipitación de proteínas del sobrenadante. A) El análisis por Western blot de sobrenadantes de cultivos de células CrFK infectadas con FCV a MOI de 0.1, en condiciones reductoras (con β ME al 1%). Se detecta la forma monomérica de LC (14 kDa). B) Análisis por Western blot de sobrenadantes de células infectadas en condiciones no reductoras (sin β ME). Se detecta una forma banda de 14 kDa que corresponde a LC monomérica y una de 28 kDa que corresponde a una forma oligomérica. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. ET: extractos totales, SN: sobrenadantes.

8.7 Desarrollo de un método de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) para la cuantificación de la viroporina LC en sobrenadantes de células infectadas.

Una vez confirmado que LC se secreta al medio extracelular en un contexto de infección, fue necesario diseñar un método que nos permitiera cuantificarla. Debido a que en nuestro laboratorio se produjeron sueros hiperinmunes anti LC (ratón y conejo), diseñamos una ELISA tipo sándwich (método 7.12). Para la estandarización de la técnica era necesario obtener la recombinante Histag-LC (Peñaflor-Téllez et al., 2022).

8.7.1 Expresión y purificación de la proteína recombinante Histag-LC.

Bacterias *E. coli* de la cepa BL21 se transformaron con el plásmido pRSETA-LC mediante choque de calor, la expresión de la proteína y el análisis de la fracción citoplasmática y de los cuerpos de inclusión se realizó mediante electroforesis en geles de acrilamida teñidos con azul de Coomassie. Se determinó que la proteína se encontraba mayoritariamente en los cuerpos de inclusión (Figura 16A).

La purificación de la proteína se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) utilizando el equipo GE AKTA FPLC. Se utilizaron columnas de cromatografía cargadas con Ni²⁺. El clarificado se filtró a través de una membrana de poros de 0.22 µm (Millipore, USA). Se pasaron 7 veces por las columnas y se pudo observar la presencia de la proteína Histag-LC purificada a una altura de 18 kDa (Figura 16 B).

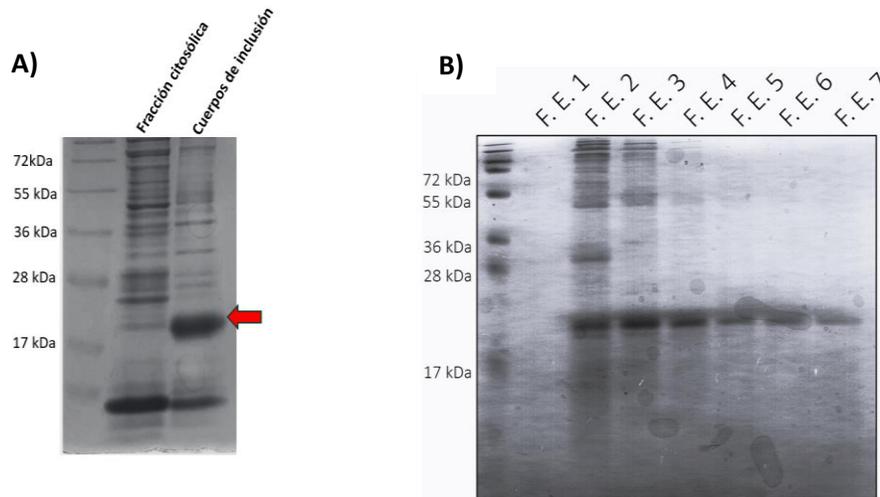


Figura 16) Expresión y purificación de la proteína recombinante Histag-LC. A) La fracción citoplásmica y de los cuerpos de inclusión se analizaron por SDS-PAGE teñido con azul de coomassie. La presencia de una banda de 18 kDa correspondiente a Histag-LC se observó en la fracción de cuerpos de inclusión. B) Análisis por SDS-PAGE de las fracciones de elución mediante el uso de FPLC, teñidas con azul de coomassie. Se observa una banda de 18 kDa correspondiente a la proteína Histag-LC en todas las fracciones de elución. F.E.: Fracción de elución.

8.7.2 Estandarización de la prueba de ELISA para la detección de LC.

En esta etapa de la estandarización, se evaluó que la técnica fuera específica para la detección de la proteína LC. Para esto, placas de ELISA de 96 pozos (Thermo Fisher, USA) se forraron con sueros hiperinmunes anti LC producidos en ratón a una dilución de 1:500 en buffer de carbonatos. En este punto se agregó la proteína recombinante Histag-LC, en concentraciones crecientes (5, 50, 500 y 1000 ng/pozo) (Figure 17) como un control positivo. De la misma manera, se utilizó a una proteína no relacionada (BSA) en concentraciones crecientes (5, 50, 5000 y 1000 ng/pozo). Los sueros anti LC producidos en conejo se utilizaron como anticuerpos de detección a una dilución de 1:1,000. Se agregó el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a HRP y se leyó en un espectrofotómetro a 415 nm.

Las lecturas obtenidas se graficaron y se observó una curva que es dependiente de concentración. Sin embargo, no se obtuvieron lecturas positivas en los pozos correspondientes a la proteína no relacionada (BSA). Estos resultados indican que con la prueba de ELISA desarrollada se detecta específicamente a la proteína Histag-LC y puede ser usada para su cuantificación en sobrenadantes de cultivos de células infectadas por FCV.

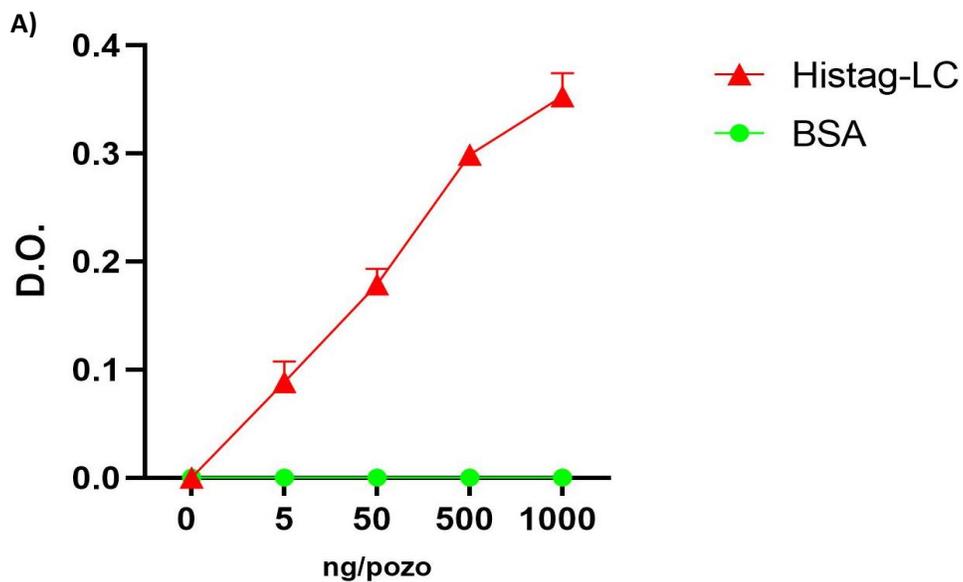


Figura 17. La prueba de ELISA (sándwich) desarrollada reconoce específicamente a la proteína recombinante Histag-LC. A) Sueros hiperinmunes anti LC producidos en ratón se utilizaron para forrar las placas de 96 pozos a una dilución de 1:500. La proteína Histag-LC a las concentraciones indicadas se utilizó como un control positivo y la D.O. correspondiente se graficó para realzar una curva estándar. La proteína BSA (proteína no relacionada) se utilizó como un control negativo y no se detectó ninguna lectura de D. O. Los datos mostrados representan a dos experimentos independientes por triplicado.

8.7.3) Identificación de la viroporina LC en sobrenadantes de cultivos celulares mediante la prueba de ELISA.

Una vez evaluada la especificidad y sensibilidad del método, determinamos la presencia de LC en sobrenadantes de cultivos de células CrFK infectados a una MOI de 5 a diferentes tiempos post infección (1, 3, 5, 7 y 9 h.p.i.). Los sobrenadantes se recogieron y se precipitaron las proteínas (procedimiento 7.5). El botón de proteína se resuspendió en 100 uL de PBS estéril y 50 uL se adicionaron a cada pozo, siguiendo el procedimiento 7.12.

Las lecturas se analizaron y mostraron que a partir de las 3 h.p.i. es posible detectar a la viroporina en los sobrenadantes, a una concentración de 5 ng/ml y ésta aumenta a medida que progresan los tiempos de infección. Esta metodología no solamente nos da la ventaja de poder cuantificar la proteína detectada, sino que resulta ser más sensible que el western blot, ya que nos permitió detectar a LC desde las 3 hpi, mientras que en los ensayos de western blot se detecta a partir de las 5 h.p.i.

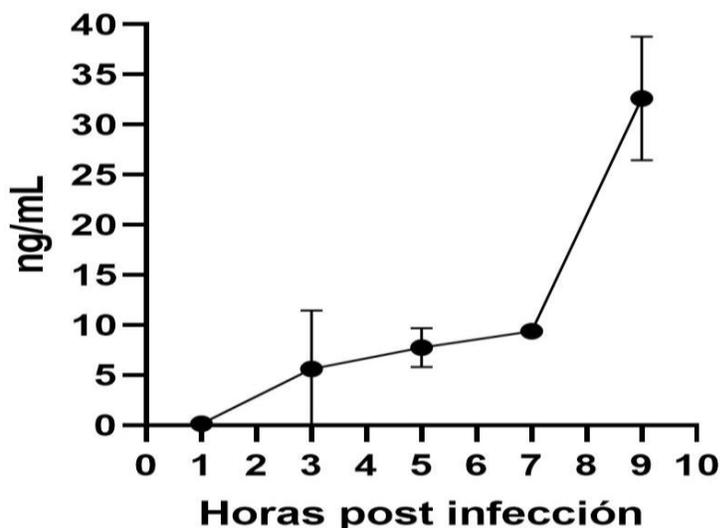


Figura 18) Determinación de la viroporina LC en sobrenadantes de células CrFK infectadas con FCV mediante ELISA. Células CrFK se infectaron con FCV a una MOI de 5. Los sobrenadantes se recogieron a diferentes horas post infección (1, 3, 5, 7 y 9 h.p.i.) y se utilizó la ELISA desarrollada en este trabajo para la

determinación de LC. Los datos mostrados representan la media de dos experimentos por triplicado.

9) Discusión

En las células eucariotas la secreción de proteínas hacia el medio extracelular es un proceso fundamental y cumple con múltiples funciones relacionadas con crecimiento celular, homeostasis, liberación de hormonas y factores importantes del sistema inmune. El mecanismo clásico de secreción de proteínas es el más estudiado y comienza cuando las proteínas son sintetizadas e ingresan al lumen del retículo endoplásmico (RE) para su correcto plegamiento y posteriormente son transportadas por un complejo vesicular al aparato de Golgi; como proceso final llegan a la membrana plasmática para su secreción (revisado en Viotti, 2016). Sin embargo, se ha visto que algunas proteínas pueden ser directamente translocadas a la membrana plasmática. Generalmente, estas proteínas se unen a lípidos. En algunos casos necesitan transportadores de tipo ABC y también pueden estar como proteínas cargo de vesículas extracelulares. Estos procesos se denominan, vías de secreción no clásicas (UPS) o no canónicas (Stewart et al., 2018).

En un contexto de infección por algunos virus se ha reportado que proteínas virales son secretadas al medio extracelular, ya sea de forma clásica como la proteína NS1 del virus del dengue (en células de vertebrado) y de forma no clásica como la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la proteína Tax (HTLV) (Alcalá et al., 2017; Alefantis et al., 2005; Ensoli et al., 1990), las cuales actúan como importantes factores de virulencia en la infección.

En la infección por FCV se ha estudiado el papel de algunas proteínas virales en las que destaca la proteína líder de la cápside (LC), la cual se ha descrito como una viroporina por su capacidad de formar oligómeros y permear membranas. Se relaciona con el establecimiento del efecto citopático, característico de la infección por FCV y con la inducción de la apoptosis cuando se expresa en un contexto libre de infección (Abente et al., 2013; Barrera-Vázquez et al., 2019; Peñaflor-Téllez et al., 2022).

En un estudio reciente en nuestro laboratorio se detectó a la proteína LC en sobrenadantes (SN) de células CrFK infectadas con FCV mediante western blot (Peñaflor-Téllez., 2023 datos no publicados). Por lo anterior pensamos que LC podría secretarse al medio extracelular y actuar como un factor de virulencia.

Para este trabajo fue necesario corroborar si LC estaba presente en los sobrenadantes de células infectadas. Para esto, precipitamos las proteínas totales de los SN provenientes de cultivos celulares infectados y se analizaron mediante western blot. Observamos que a partir de las 5 horas post infección (h.p.i.) es posible detectar a la proteína en el medio extracelular. Sin embargo, la infección por FCV induce apoptosis y la presencia de LC pudiera relacionarse con eventos de lisis celular. Para dilucidar esto, realizamos ensayos para determinar la integridad de la membrana plasmática en la infección por FCV en células CrFK, utilizando el reactivo SYTOX Green, el cual es un tinte fluorescente que se une al DNA y es permeable solamente en células con membranas plasmáticas comprometidas, siendo un excelente marcador de integridad de la membrana plasmática (He et al., 2017; Machado & Soares, 2012; McKenzie et al., 2016). Mediante microscopia de epifluorescencia pudimos demostrar que no se detectó señal del reactivo en las células de la condición MOCK ni tampoco en las células de la condición de infección a MOI de 0.1 y 5, evaluadas a las 1, 3, 5, 7 y 9 h.p.i. Estos datos indican que la infección por FCV en células CrFK no compromete la membrana plasmática celular, al menos hasta las 9 h.p.i. Sugiriendo que la presencia de LC en el sobrenadante no se debe a una pérdida de la integridad de la membrana.

Por otro lado, evaluamos el estado metabólico de las células en la infección por FCV por medio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), el cual es un reactivo que es permeable a la membrana plasmática y a la membrana interna mitocondrial donde es reducido a formazán por deshidrogenasas celulares en los diferentes pasos de la glicolisis y ha sido ampliamente utilizado como un indicador de la viabilidad celular (Berridge et al., 2005). Para esto, cultivos celulares se infectaron a una MOI de 5 y se incubaron con el reactivo de MTT (Sigma, USA) a diferentes tiempos post infección (3, 5, 7 y 9 h.p.i.). No se observó una disminución

estadísticamente significativa en la formación de formazán (ANOVA $p > 0.05$), en ninguna de las condiciones de infección comparado con la condición MOCK (Figura 11), sugiriendo que la infección por FCV en células CrFK no induce un cambio importante en el estado metabólico celular. Debido a que no hay reportes en nuestro modelo de estudio (FCV), estos resultados son interesantes ya que se ha visto que en algunas infecciones por virus de RNA, procesos como la glicolisis son regulados al alza para la replicación eficiente del virus, (Fontaine et al., 2014; Ripoli et al., 2010). Sin embargo, son necesarios más experimentos para dilucidar que es lo que realmente pasa en la infección por FCV. Las metodologías que se utilizaron (MTT y SYTX Green), mostraron que en general, la viabilidad celular no se ve afectada drásticamente en la infección por FCV, al menos hasta las 9 h.p.i. lo que indica que la presencia de la viroporina LC en sobrenadantes de cultivos se debe a procesos de secreción y no a lisis celular.

Debido a la falta de un sistema para la cuantificación de LC en sobrenadantes fue necesario desarrollar un ensayo inmunoenzimático de adsorción (ELISA) de tipo sándwich (Hornbeck, 2015), utilizando sueros hiperinmunes anti-LC (ratón y conejo) producidos en nuestro laboratorio, siguiendo la metodología antes descrita (metodología 7.12). Para realizar la estandarización de la técnica fue necesario producir la proteína recombinante Histag-LC. Se comprobó que la técnica solo reconocía a la proteína recombinante específicamente y que el aumento en la O.D. en las lecturas era dependiente de la concentración (Figura 16). Una vez ya validado nuestro sistema, realizamos las mediciones en los sobrenadantes de cultivos celulares infectados (Figura 17) a diferentes tiempos post infección (1, 3, 5, 7 y 9 h.p.i.) y encontramos que la viroporina LC se puede detectar a partir de tiempos tempranos de la infección (3 h.p.i.) y su concentración aumenta conforme progresa la infección, encontrando los niveles más altos a las 7 y 9 h.p.i. Estos resultados coinciden con la expresión de LC en las células infectadas, ya que se sabe que a partir de las 3 h.p.i. es cuando se detecta a LC y VP1 en extractos totales celulares.

La expresión de ambas proteínas se da simultáneamente debido a que se codifican en el mismo marco de lectura y se traducen como un precursor (Sosnovtsev et al., 2002). Sin embargo, en los sobrenadantes solo es posible detectar a la viroporina LC y no a la proteína estructural VP1, lo que sugiere que LC es secretada desde su traducción hacia el medio extracelular y de manera selectiva.

La secreción de viroporinas ha sido un tema poco estudiado, y en algunos casos se relacionan con la patogenia de la infección. Un claro ejemplo es la infección por rotavirus, donde se produce la glicoproteína NSP4 la cual tiene múltiples localizaciones y funciones en la célula. Una de ellas, es la función de viroporina e impacta directamente en la homeostasis del Ca^2 celular. Además, se ha reportado que un producto de 66 aminoácidos (del 112-175) puede ser secretado al medio extracelular clasificándose como la primera enterotoxina de origen viral descrita y se relaciona con el establecimiento de diarrea en personas infectadas (Ball et al., 1996; Nilsson et al., 1989; Zhang et al., 2000). Otro ejemplo, es la infección por el virus del Ébola, donde se ha observado que un producto de la glicoproteína soluble (sGP), denominado péptido delta, también puede secretarse al medio extracelular y se ha encontrado en altas cantidades en muestras sanguíneas de pacientes convalecientes. El péptido delta está clasificado como una viroporina, ya que tiene una gran capacidad para permear membranas celulares y además se ha comprobado su papel de enterotoxina. Cabe señalar que esta proteína carece de algún péptido señal y no contiene regiones transmembranas (He et al., 2017; Melnik et al., 2022; Sanchez et al., 1998; Schieffelin et al., 2014). En nuestro modelo de estudio y hablando específicamente de la viroporina LC, no existen reportes sobre su secreción. Sin embargo, hay algunas características que se comparten entre sí y es la capacidad de permeabilizar membranas celulares (Peñaflor-Téllez., 2023 datos no publicados) y la carencia de algún péptido señal, por lo que sugerimos que su secreción no está mediada por la ruta clásica de secreción.

Peñaflor-Téllez., 2023 demostró que la localización de LC es citoplasmática y también se encuentra asociada a la proteína celular Anexina 2 (A2) en la membrana plasmática. A2 es una proteína con múltiples funciones en la célula; entre las que destaca su asociación con la formación de cuerpos multivesiculares, endocitosis, exocitosis y se ha encontrado como proteína cargo de exosomas (Abente et al., 2013; Futter & White, 2007; Mayran et al., 2003). Por lo anterior, quisimos explorar si la viroporina LC podía asociarse a algún tipo de vesículas extracelulares (EVs). El análisis de los sobrenadantes y la separación de EVs mediante centrifugación diferencial permitió la obtención de 4 sedimentos con diferentes contenidos vesiculares. El sedimento 4 (VEP) se evaluó por microscopía de transmisión (MET) y se observaron algunas estructuras de doble membrana, que van desde los 100-170 nm de diámetro, muy parecidas a EVs (Guerreiro et al., 2018; Mizenko et al., 2022), tanto en las células MOCK como en las infectadas, con lo que corroboramos el aislamiento de estas EVs. El análisis del contenido de estas fracciones mediante ensayos de western blot nos permitió identificar a la proteína Alix, la cual se sabe que está involucrada en la biogénesis de los cuerpos multivesiculares y se utiliza como un marcador de exosomas (Ghossoub et al., 2014). En estas mismas fracciones, pudimos identificar la presencia de LC, corroborando que esta puede estar siendo secretada hacia el medio extracelular mediante EVs. Aunque pudimos identificar la presencia de Alix en las fracciones 1, 2 y 3 (VEG) provenientes de células MOCK e infectadas, observamos una mayor detección en la condición de infección. Esto concuerda con lo reportado en algunas infecciones por virus de RNA donde se ha observado un aumento los niveles de Alix y la producción de EVs (Chahar et al., 2018; Jiang et al., s. f.). Sin embargo, no hemos podido determinar hasta ahora, si en las condiciones de infección por FCV, este aumento en la detección de Alix se debe a una mayor producción de EVs.

En cuanto a LC, la pudimos detectar en todos los sedimentos en la condición de infección. Nos resulta interesante su detección en los sedimentos 3 (VEG) y 4 (VEP) ya que con esto confirmamos que la LC se puede asociar a algún tipo de EV. Sin embargo, es necesario un análisis más profundo para determinar qué tipo o población de EVs contiene a LC. Además, es importante determinar si LC se encuentra como una proteína cargo o como una proteína transmembrana, para conocer un poco más su papel en la infección y en la citopatogenia asociada a la infección por FCV.

En los últimos años se ha estudiado la asociación de proteínas virales que actúan como factores importantes de virulencia con EVs. Una de ellas es la proteína Tat del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), la cual puede secretarse como proteína soluble y asociada a EV. Y al igual que LC, se relaciona con la inducción de apoptosis (Chen et al., 2002; Mele et al., 2018). Por otro lado, en la infección por el virus de Zika, se observó que la proteína de envoltura (E) forma parte de EVs como una proteína transmembrana para ser reconocidas por anticuerpos neutralizantes, sirviendo como un método de evasión de la respuesta inmune (Zhao et al., 2023).

En este trabajo se reporta por primera vez que la vioporina LC puede secretarse como una proteína soluble, que puede formar oligómeros en el medio extracelular y que, además, se encuentra asociada a EVs. Sin embargo, es necesario continuar con otros estudios para la comprensión de estos procesos y dilucidar el verdadero papel de LC en la infección, ya que cumple con varias características que la hacen ver como un factor de virulencia importante en la infección. Comprender su función permitirá poder utilizarla como un posible blanco para el desarrollo de estrategias antivirales.

10) Conclusiones

- La viroporina LC del FCV es secretada al medio extracelular a partir de las 3 hpi, de manera concomitante a su síntesis y en concentraciones del orden de los ng.
- La viroporina LC se secreta como una proteína soluble y forma oligómeros en el medio extracelular.
- La viroporina LC se asocia a diversas vesículas extracelulares.

11) Perspectivas

- Determinar la vía de secreción de la viroporina LC en células CrFK infectadas por FCV.
- Determinar el efecto de la viroporina LC secretada en células no infectadas.
- Determinar el tipo de vesículas extracelulares que contienen a LC y su localización.
- Evaluar el efecto de las vesículas extracelulares que contienen a LC en células no infectadas.
- Inhibir la secreción de exosomas en células infectadas y evaluar su efecto en la secreción de LC y en el ciclo replicativo de FCV.

12) Bibliografía

- 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>
- Aboubakr, H. A., Mor, S. K., Higgins, L., Armien, A., Youssef, M. M., Bruggeman, P. J., & Goyal, S. M. (2018). Cold argon-oxygen plasma species oxidize and disintegrate capsid protein of feline calicivirus. *PloS One*, *13*(3), e0194618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194618>
- Ahmed, S. M., Hall, A. J., Robinson, A. E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U. D., Koopmans, M., & Lopman, B. A. (2014). Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, *14*(8), 725-730. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70767-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70767-4)
- Alcalá, A. C., Hernández-Bravo, R., Medina, F., Coll, D. S., Zambrano, J. L., Del Angel, R. M., & Ludert, J. E. (2017). The dengue virus non-structural protein 1 (NS1) is secreted from infected mosquito cells via a non-classical caveolin-1-dependent pathway. *The Journal of General Virology*, *98*(8), 2088-2099. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000881>
- Aldabe, R., Irurzun, A., & Carrasco, L. (1997). Poliovirus protein 2BC increases cytosolic free calcium concentrations. *Journal of Virology*, *71*(8), 6214-6217.
- Alefantis, T., Mostoller, K., Jain, P., Harhaj, E., Grant, C., & Wigdahl, B. (2005). Secretion of the human T cell leukemia virus type I transactivator protein tax.

The Journal of Biological Chemistry, 280(17), 17353-17362.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M409851200>

Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2006). The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterology Clinics of North America*, 35(2), 275-290, viii. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2006.03.001>

Baez-Navarro, C., Quevedo, I. R., López, S., Arias, C. F., & Iša, P. (2022). The Association of Human Astrovirus with Extracellular Vesicles Facilitates Cell Infection and Protects the Virus from Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*, 96(14), e00848-22. <https://doi.org/10.1128/jvi.00848-22>

Bailey, D., Kaiser, W. J., Hollinshead, M., Moffat, K., Chaudhry, Y., Wileman, T., Sosnovtsev, S. V., & 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>

Ball, J. M., Tian, P., Zeng, C. Q., Morris, A. P., & Estes, M. K. (1996). Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5258), 101-104. <https://doi.org/10.1126/science.272.5258.101>

Barco, A., & Carrasco, L. (1995). A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 14(14), 3349-3364.

Barrera-Vázquez, O. S., Cancio-Lonches, C., Hernández-González, O., Chávez-Munguia, B., Villegas-Sepúlveda, N., & Gutiérrez-Escolano, A. L. (2019). The feline calicivirus leader of the capsid protein causes survivin and XIAP

- downregulation and apoptosis. *Virology*, 527, 146-158.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.11.017>
- Berger, A. K., & Danthi, P. (2013). Reovirus Activates a Caspase-Independent Cell Death Pathway. *mBio*, 4(3), e00178-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00178-13>
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. En *Biotechnology Annual Review* (Vol. 11, pp. 127-152). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Breitinger, U., Farag, N. S., Sticht, H., & Breitinger, H.-G. (2022). Viroporins: Structure, function, and their role in the life cycle of SARS-CoV-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 145, 106185. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106185>
- Bugarcic, A., & Taylor, J. A. (2006). Rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 is secreted from the apical surfaces of polarized epithelial cells. *Journal of Virology*, 80(24), 12343-12349. <https://doi.org/10.1128/JVI.01378-06>
- Cao, Y., Yang, R., Lee, I., Zhang, W., Sun, J., Wang, W., & Meng, X. (2021). Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 30(6), 1114-1130. <https://doi.org/10.1002/pro.4075>
- Chahar, H. S., Corsello, T., Kudlicki, A. S., Komaravelli, N., & Casola, A. (2018). Respiratory Syncytial Virus Infection Changes Cargo Composition of Exosome Released from Airway Epithelial Cells. *Scientific Reports*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18672-5>

- Chen, D., Wang, M., Zhou, S., & Zhou, Q. (2002). HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *The EMBO Journal*, 21(24), 6801-6810. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf683>
- 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>
- Desselberger, U. (2019). Caliciviridae Other Than Noroviruses. *Viruses*, 11(3), E286. <https://doi.org/10.3390/v11030286>
- Díaz, Y., Chemello, M. E., Peña, F., Aristimuño, O. C., Zambrano, J. L., Rojas, H., Bartoli, F., Salazar, L., Chwetzoff, S., Sapin, C., Trugnan, G., Michelangeli, F., & Ruiz, M. C. (2008). Expression of Nonstructural Rotavirus Protein NSP4 Mimics Ca²⁺ Homeostasis Changes Induced by Rotavirus Infection in Cultured Cells. *Journal of Virology*, 82(22), 11331-11343. <https://doi.org/10.1128/JVI.00577-08>
- Didsbury, A., Wang, C., Verdon, D., Sewell, M. A., McIntosh, J. D., & Taylor, J. A. (2011). Rotavirus NSP4 is secreted from infected cells as an oligomeric lipoprotein and binds to glycosaminoglycans on the surface of non-infected cells. *Virology Journal*, 8, 551. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-551>
- Ensoli, B., Barillari, G., Salahuddin, S. Z., Gallo, R. C., & Wong-Staal, F. (1990). Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature*, 345(6270), 84-86. Scopus. <https://doi.org/10.1038/345084a0>

- Ettayebi, K., Crawford, S. E., Murakami, K., Broughman, J. R., Karandikar, U., Tenge, V. R., Neill, F. H., Blutt, S. E., Zeng, X.-L., Qu, L., Kou, B., Opekun, A. R., Burrin, D., Graham, D. Y., Ramani, S., Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2016). Replication of Human Noroviruses in Stem Cell-Derived Human Enteroids. *Science (New York, N.Y.)*, *353*(6306), 1387-1393. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5211>
- Fontaine, K. A., Sanchez, E. L., Camarda, R., & Lagunoff, M. (2014). Dengue Virus Induces and Requires Glycolysis for Optimal Replication. *Journal of Virology*, *89*(4), 2358-2366. <https://doi.org/10.1128/JVI.02309-14>
- Futter, C. E., & White, I. J. (2007). Annexins and endocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *8*(8), 951-958. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00590.x>
- Ghossoub, R., Lembo, F., Rubio, A., Gaillard, C. B., Bouchet, J., Vitale, N., Slavík, J., Machala, M., & Zimmermann, P. (2014). Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nature Communications*, *5*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms4477>
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberté, J.-F., & Roberts, L. (2005). Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF4E. *EMBO Reports*, *6*(10), 968-972. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400510>
- Guerreiro, E. M., Vestad, B., Steffensen, L. A., Aass, H. C. D., Saeed, M., Øvstebø, R., Costea, D. E., Galtung, H. K., & Sølund, T. M. (2018). Efficient extracellular vesicle isolation by combining cell media modifications,

- ultrafiltration, and size-exclusion chromatography. *PloS One*, 13(9), e0204276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204276>
- Gutiérrez-Escolano, A. L. (2014, marzo 3). *Host-cell factors involved in the calicivirus replicative cycle* (London, UK). [Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fvl.13.125](http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fvl.13.125); Future Medicine Ltd London, UK. <https://doi.org/10.2217/fvl.13.125>
- He, J., Melnik, L. I., Komin, A., Wiedman, G., Fuselier, T., Morris, C. F., Starr, C. G., Searson, P. C., Gallaher, W. R., Hristova, K., Garry, R. F., & Wimley, W. C. (2017). Ebola Virus Delta Peptide Is a Viroporin. *Journal of Virology*, 91(16), e00438-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00438-17>
- Hornbeck, P. V. (2015). Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current Protocols in Immunology*, 110(1), 2.1.1-2.1.23. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0201s110>
- Hyser, J. M., Collinson-Pautz, M. R., Utama, B., & Estes, M. K. (2010). Rotavirus Disrupts Calcium Homeostasis by NSP4 Viroporin Activity. *mBio*, 1(5), e00265-10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00265-10>
- Jakobs, C., Bartok, E., Kubarenko, A., Bauernfeind, F., & Hornung, V. (2013). Immunoblotting for active caspase-1. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1040, 103-115. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-523-1_9
- Jiang, W., Ma, P., Deng, L., Liu, Z., Wang, X., Liu, X., & Long, G. (s. f.). Hepatitis A virus structural protein pX interacts with ALIX and promotes the secretion of virions and foreign proteins through exosome-like vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1), 1716513. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1716513>

- Jones, M. K., Grau, K. R., Costantini, V., Kolawole, A. O., de Graaf, M., Freiden, P., Graves, C. L., Koopmans, M., Wallet, S. M., Tibbetts, S. A., Schultz-Cherry, S., Wobus, C. E., Vinjé, J., & Karst, S. M. (2015). Human norovirus culture in B cells. *Nature protocols*, *10*(12), 1939-1947. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.121>
- Jourdan, N., Maurice, M., Delautier, D., Quero, A. M., Servin, A. L., & Trugnan, G. (1997). Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *Journal of Virology*, *71*(11), 8268-8278. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.11.8268-8278.1997>
- Kim, Y., Lovell, S., Tiew, K.-C., Mandadapu, S. R., Alliston, K. R., Battaile, K. P., Groutas, W. C., & Chang, K.-O. (2012). Broad-Spectrum Antivirals against 3C or 3C-Like Proteases of Picornaviruses, Noroviruses, and Coronaviruses. *Journal of Virology*, *86*(21), 11754-11762. <https://doi.org/10.1128/JVI.01348-12>
- Knipe, D. M., & Howley, P. (2013). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Machado, M. D., & Soares, E. V. (2012). Development of a short-term assay based on the evaluation of the plasma membrane integrity of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *95*(4), 1035-1042. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4185-y>
- Makino, A., Shimojima, M., Miyazawa, T., Kato, K., Tohya, Y., & Akashi, H. (2006). Junctional Adhesion Molecule 1 Is a Functional Receptor for Feline Calicivirus. *Journal of Virology*, *80*(9), 4482-4490. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.9.4482-4490.2006>

- Maloney, N. S., Thackray, L. B., Goel, G., Hwang, S., Duan, E., Vachharajani, P., Xavier, R., & Virgin, H. W. (2012). Essential Cell-Autonomous Role for Interferon (IFN) Regulatory Factor 1 in IFN- γ -Mediated Inhibition of Norovirus Replication in Macrophages. *Journal of Virology*, *86*(23), 12655-12664. <https://doi.org/10.1128/JVI.01564-12>
- Martin-Serrano, J., & Neil, S. J. D. (2011). Host factors involved in retroviral budding and release. *Nature Reviews. Microbiology*, *9*(7), 519-531. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2596>
- Mayran, N., Parton, R. G., & Gruenberg, J. (2003). Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *The EMBO Journal*, *22*(13), 3242-3253. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg321>
- McKenzie, K., Maclean, M., Grant, M. H., Ramakrishnan, P., MacGregor, S. J., & Anderson, J. G. (2016). The effects of 405 nm light on bacterial membrane integrity determined by salt and bile tolerance assays, leakage of UV-absorbing material and SYTOX green labelling. *Microbiology*, *162*(9), 1680-1688. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000350>
- Mele, A. R., Marino, J., Chen, K., Pirrone, V., Janetopoulos, C., Wigdahl, B., Klase, Z., & Nonnemacher, M. R. (2018). Defining the molecular mechanisms of HIV-1 Tat secretion: PtdIns(4,5)P₂ at the epicenter. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10.1111/tra.12578. <https://doi.org/10.1111/tra.12578>
- Melnik, L. I., Guha, S., Ghimire, J., Smither, A. R., Beddingfield, B. J., Hoffmann, A. R., Sun, L., Ungerleider, N. A., Baddoo, M. C., Flemington, E. K., Gallaher,

- W. R., Wimley, W. C., & Garry, R. F. (2022). Ebola virus delta peptide is an enterotoxin. *Cell Reports*, 38(1). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110172>
- Mizenko, R. R., Brostoff, T., Jackson, K., Pesavento, P. A., & Carney, R. P. (s. f.). Extracellular Vesicles (EVs) Are Copurified with Feline Calicivirus, yet EV-Enriched Fractions Remain Infectious. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e01211-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01211-22>
- Netzler, N. E., Enosi Tuipulotu, D., & White, P. A. (2019). Norovirus antivirals: Where are we now? *Medicinal Research Reviews*, 39(3), 860-886. <https://doi.org/10.1002/med.21545>
- Nieva, J. L., Madan, V., & Carrasco, L. (2012). Viroporins: Structure and biological functions. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(8), 563-574. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2820>
- Nilsson, T., Jackson, M., & Peterson, P. A. (1989). Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 58(4), 707-718. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90105-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90105-0)
- Oka, T., Wang, Q., Katayama, K., & Saif, L. J. (2015). Comprehensive review of human sapoviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 32-53. <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-14>
- Oka, T., Yamamoto, M., Yokoyama, M., Ogawa, S., Hansman, G. S., Katayama, K., Miyashita, K., Takagi, H., Tohya, Y., Sato, H., & Takeda, N. (2007). Highly Conserved Configuration of Catalytic Amino Acid Residues among Calicivirus-Encoded Proteases. *Journal of Virology*, 81(13), 6798-6806. <https://doi.org/10.1128/JVI.02840-06>

- 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*, 14(3), 635. <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. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02334>
- Pringle, K., Lopman, B., Vega, E., Vinje, J., Parashar, U. D., & Hall, A. J. (2015). Noroviruses: Epidemiology, immunity and prospects for prevention. *Future Microbiology*, 10(1), 53-67. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.102>
- Ripoli, M., D'Aprile, A., Quarato, G., Sarasin-Filipowicz, M., Gouttenoire, J., Scrima, R., Cela, O., Boffoli, D., Heim, M. H., Moradpour, D., Capitano, N., & Piccoli, C. (2010). Hepatitis C Virus-Linked Mitochondrial Dysfunction Promotes Hypoxia-Inducible Factor 1 α -Mediated Glycolytic Adaptation. *Journal of Virology*, 84(1), 647-660. <https://doi.org/10.1128/JVI.00769-09>
- Robinson, B. A., Winkle, J. A. V., McCune, B. T., Peters, A. M., & Nice, T. J. (2019). Caspase-mediated cleavage of murine norovirus NS1/2 potentiates apoptosis and is required for persistent infection of intestinal epithelial cells. *PLOS Pathogens*, 15(7), e1007940. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007940>
- Sanchez, A., Yang, Z.-Y., Xu, L., Nabel, G. J., Crews, T., & Peters, C. J. (1998). Biochemical Analysis of the Secreted and Virion Glycoproteins of Ebola Virus. *Journal of Virology*, 72(8), 6442-6447.

- Schieffelin, J. S., Shaffer, J. G., Goba, A., Gbakie, M., Gire, S. K., Colubri, A., Sealfon, R. S. G., Kanneh, L., Moigboi, A., Momoh, M., Fullah, M., Moses, L. M., Brown, B. L., Andersen, K. G., Winnicki, S., Schaffner, S. F., Park, D. J., Yozwiak, N. L., Jiang, P.-P., ... WHO Clinical Response Team. (2014). Clinical illness and outcomes in patients with Ebola in Sierra Leone. *The New England Journal of Medicine*, 371(22), 2092-2100. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411680>
- 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>
- Sosnovtsev, S. V., & Green, K. Y. (2000). Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology*, 277(1), 193-203. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0579>
- Sosnovtsev, S. V., Prikhod'ko, E. A., Belliot, G., Cohen, J. I., & Green, K. Y. (2003). Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Research*, 94(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(03\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00115-1)
- Sosnovtsev, S. V., Sosnovtseva, S. A., & Green, K. Y. (1998). Cleavage of the Feline Calicivirus Capsid Precursor Is Mediated by a Virus-Encoded Proteinase. *Journal of Virology*, 72(4), 3051-3059.

- Stewart, S. E., Ashkenazi, A., Williamson, A., Rubinsztein, D. C., & Moreau, K. (2018). Transbilayer phospholipid movement facilitates the translocation of annexin across membranes. *Journal of Cell Science*, 131(14), jcs217034. <https://doi.org/10.1242/jcs.217034>
- Stuart, A. D., & Brown, T. D. K. (2007). Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *The Journal of General Virology*, 88(Pt 1), 177-186. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82158-0>
- Suhy, D. A., Giddings, T. H., & Kirkegaard, K. (2000). Remodeling the Endoplasmic Reticulum by Poliovirus Infection and by Individual Viral Proteins: An Autophagy-Like Origin for Virus-Induced Vesicles. *Journal of Virology*, 74(19), 8953-8965.
- Vashist, S., Bailey, D., Putics, A., & Goodfellow, I. (2009). Model systems for the study of human norovirus Biology. *Future virology*, 4(4), 353-367. <https://doi.org/10.2217/fvl.09.18>
- Vinje, J., Estes, M. K., Esteves, P., Green, K. Y., Katayama, K., Knowles, N. J., L'Homme, Y., Martella, V., Vennema, H., White, P. A., & Ictv Report Consortium, null. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *The Journal of General Virology*, 100(11), 1469-1470. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001332>
- Viotti, C. (2016). ER to Golgi-Dependent Protein Secretion: The Conventional Pathway. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1459, 3-29. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3804-9_1
- World Health Organization. (2016). *WHO: Ebola situation report*.

Zhang, M., Zeng, C. Q.-Y., Morris, A. P., & Estes, M. K. (2000). A Functional NSP4 Enterotoxin Peptide Secreted from Rotavirus-Infected Cells. *Journal of Virology*, 74(24), 11663-11670. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.24.11663-11670.2000>

Zhao, F., Xu, Y., Liu, N., Lv, D., Chen, Y., Liu, Z., Jin, X., Xiao, M., Lavillette, D., Zhong, J., Bartenschlager, R., & Long, G. (2023). Extracellular vesicles from Zika virus-infected cells display viral E protein that binds ZIKV-neutralizing antibodies to prevent infection enhancement. *The EMBO Journal*, 42(6), e112096. <https://doi.org/10.15252/emj.2022112096>