

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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGENESIS MOLECULAR**

**Análisis de la inhibición de la proteína de choque térmico de 90 kDa sobre los
niveles de la proteína mayoritaria de la cápside VP1 durante el ciclo de
replicación del calicivirus felino**

TESIS

Que presenta

M. EN C. CAROLINA PÉREZ IBÁÑEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS EXPERIMENTAL

Directora de tesis:
DRA. ANA LORENA GUTIÉRREZ ESCOLANO

Ciudad de México.

Agosto 2023

Tabla de contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
CALICIVIRUS FELINO	4
<i>La partícula viral de FCV</i>	5
<i>Organización del genoma viral</i>	8
<i>Proteína mayoritaria de la cápside</i>	10
<i>El ciclo de replicación</i>	11
<i>Proteínas de choque térmico</i>	16
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
CÉLULAS Y STOCK VIRAL	24
OBTENCIÓN DE EXTRACTOS TOTALES Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	24
TÍTULO VIRAL POR ENSAYOS DE PLAQUEO	25
INDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA VP1 EN BACTERIAS BL21 (DE3) pLYSS	27
PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA VP1-GST POR ELECTROELUCIÓN	29
GENERACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-VP1 EN RATÓN	30
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA Y WESTERN BLOT	31
FÁRMACOS Y TRATAMIENTOS	33
ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR	33
ENSAYO DE LIGACIÓN POR PROXIMIDAD	35
RESULTADOS	38
LA PROTEÍNA Hsp90 ES NECESARIA PARA LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA ESTRUCTURAL VP1	41
LA INHIBICIÓN DE Hsp90 FAVORECE UN AUMENTO EN LA TRADUCCIÓN DEL PRECURSOR LC-VP1	45
LA PROTEÍNA VP1 DE FCV ES CLIENTE DE Hsp90	48
LA VÍA DE AUTOFAGIA NO ES RESPONSABLE DE LA DEGRADACIÓN DE VP1	49
LA INHIBICIÓN DE LA VÍA PROTEOSOMAL TIENE UN EFECTO NEGATIVO EN LA REPLICACIÓN DE FCV	52

DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	66
PROSPECTIVAS.....	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

Tabla de Imágenes

<i>Figura 1 Ejes de simetría de un icosaedro.</i>	5
<i>Figura 2 Arquitectura de la cápside viral basada en la teoría de Caspar y Klug.</i>	6
<i>Figura 3 Partícula viral de FCV.</i>	7
<i>Figura 4 Organización genómica del FCV.</i>	9
<i>Figura 5 Proteína mayoritaria de la cápside.</i>	10
<i>Figura 6 Replicación del RNA genómico y del RNA subgenómico.</i>	13
<i>Figura 7 Ciclo de replicación del FCV.</i>	15
<i>Figura 8 Dominios de la proteína Hsp90.</i>	19
<i>Figura 9 Obtención de extractos proteicos totales.</i>	25
<i>Figura 10 Ensayo de plaqueo.</i>	27
<i>Figura 11 La inducción de la proteína recombinante VP1-GST ocurre en cuerpos de inclusión.</i>	29
<i>Figura 12 Sepacación de las proteínas de la fracción solubilizada de cuerpos de inclusión.</i>	30
<i>Figura 13 Esquema de inmunización de ratones para obtención de anticuerpos contra VP1.</i>	31
<i>Figura 14 Titulación de suero inmune contra VP1.</i>	31
<i>Figura 15 Ensayo de viabilidad celular por MTT.</i>	35
<i>Figura 16 Ensayo de ligación por proximidad (PLA) DuoLink[®].</i>	37
<i>Figura 17 La infección por FCV no modula la expresión de Hsp90.</i>	38
<i>Figura 18 La inhibición de la actividad de Hsp90 no tiene un efecto significativo en la viabilidad de las células CrFK.</i>	39
<i>Figura 19 La producción de partículas virales de células disminuye significativamente cuando se inhibe la actividad de Hsp90.</i>	41
<i>Figura 20 La actividad de Hsp90 afecta la estabilidad de proteína estructural VP1 pero no de la no estructural NS6/7.</i>	43
<i>Figura 21 Geldanamicina regula negativamente la expresión de VP1 cuando es añadida desde tiempos tempranos de la infección.</i>	44
<i>Figura 22 El precursor LC - VP1 aumenta cuando la actividad de Hsp90 está inactiva.</i>	47
<i>Figura 23 La proteína VP1 interactúa con Hsp90.</i>	49
<i>Figura 24 El tratamiento con CQ no afecta la viabilidad de células CrFK.</i>	50
<i>Figura 25 La inhibición de la autofagia no recupera los niveles basales de VP1.</i>	51
<i>Figura 26 El tratamiento con MG132 solo o combinado con GA no afecta la viabilidad de células CrFK.</i>	53
<i>Figura 27 La inhibición del proteosoma no recupera los niveles basales de VP1.</i>	54
<i>Figura 28 La proteína STING se degrada durante el ciclo de infección de FCV.</i>	56
<i>Figura 29 La proteína VP1 tiene un motivo KFERQ-like.</i>	61
<i>Figura 30 La proteína VP1 se degrada via proteosomal cuando Hsp90 está inactiva.</i>	65

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (CVU: 780786) y por la beca del proyecto 302965, PRONAI 3: Infecciones virales del tracto gastrointestinal. Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por brindar un espacio como pocos para realización de investigación básica y al Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular por permitir la realización de mis estudios de posgrado.

A mis asesores, el Dr. Carlos Sandoval Jaime del IBT UNAM, a la Dra Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres del DIPM y de manera particular al Dr. Juan Pedro Luna Arias por su paciencia y compromiso durante la revisión de este manuscrito y de igual manera al Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández por el incansable compromiso de hacer que escriba de manera correcta en castellano.

A mi directora de tesis, la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, por su apoyo inagotable durante todos estos años, en la academia y fuera de ella. Porque su confianza en mí siempre fue un impulso para seguir adelante.

A los técnicos Óscar Casas Mejía, Juan Manuel Ceballos Ramírez y a Ranferi Andrés Pérez, porque a pesar de que ninguno se desempeña como técnico del laboratorio de virología, me prestaron su ayuda cada una de las veces que los necesité. De manera especial a Víctor Hernández Pinales, el laboratorio y la forma en que se puede trabajar han mejorado muchísimo gracias a él.

A Irma Edith Miranda Orea por su constancia y dedicación a nuestro laboratorio.

Al Dr. José Raymundo Cruz Pérez a quien recurrí una infinidad de veces, auxiliar de investigación del laboratorio a cargo del Dr. Juan Ludert, quien a pesar de que

tampoco es personal adscrito al laboratorio de la Dra. Ana Lorena fue una ayuda constante, tan constante como cuando realicé mi maestría, su compromiso con nuestra formación como científicos es inestimable.

A Carlos Vázquez Calzada auxiliar del laboratorio a cargo del Dr. Mario Alberto Rodríguez, por su amistad y apoyo incansable durante todas las sesiones de microscopía confocal y fuera de ellas.

A Raúl Bonilla Moreno, auxiliar del laboratorio a cargo del Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda del departamento de Biomedicina Molecular por su compromiso con el desarrollo de la parte final de este proyecto.

A Randy, Yoatzin y Adri, porque tres son compañía. El laboratorio fue una segunda casa para mí y su sola presencia lo hizo aún mejor. La amistad y compañerismo que encontré en ellos es algo que no puedo terminar de agradecer, la música en las tardes, las series en las noches, las discusiones de filosofía, de cine y de la vida en general las voy a atesorar toda mi vida.

A Javier Rendón por ser tú, por tu amor y compañía que me motivan todos los días a alcanzar mis metas.

A mis padres, Lucía Ibáñez y Silverio Pérez. Su amor incondicional y su apoyo incansable han sido, son y serán el pilar de todo lo que soy. Sin ellos, todo este proyecto de vida no habría sido posible.

Resumen

La familia *Caliciviridae* está compuesta por once géneros, dentro de ella se encuentran agentes de importancia pecuaria, veterinaria y de salud pública. Los calicivirus tienen una cápside icosaédrica, son no envueltos, con un genoma de RNA de una sola hebra no segmentado de polaridad positiva.

Para estudiar la biología molecular de la familia *Caliciviridae* se usan como modelos dos miembros de la familia: el *Calicivirus felino* (FCV) y el *Norovirus murino* (MNV). Muchos grupos han enfatizado la relevancia de distintas proteínas celulares para la replicación y traducción del genoma viral, en concordancia, este trabajo se enfocó en el papel de la proteína Hsp90 durante el ciclo de replicación de FCV. Inicialmente demostramos que durante la infección no cambia el nivel de expresión de Hsp90 y que al inhibir a esta chaperona con geldanamicina (GA), disminuye de manera significativa la producción de partículas virales infecciosas. Nuestros resultados sugieren que la consecuencia principal de inhibir a Hsp90 es la reducción de los niveles de la proteína mayoritaria de la cápside (VP1), lo cual concuerda con reportes previos de otros grupos que identificaron que VP1 del MNV es una proteína cliente de Hsp90. Para validar esto, evaluamos la interacción directa entre la VP1 del FCV y la proteína Hsp90 a través del ensayo de ligación por proximidad con el que observamos la interacción directa entre VP1-Hsp90, lo que indica que la proteína VP1 del FCV es cliente de Hsp90. Por lo tanto, se decidió intentar determinar la vía de degradación de VP1. Nuestros resultados demuestran que la autofagia no está involucrada en la degradación de VP1, ya que al inhibirla, no se recuperaron los niveles basales de la proteína. De igual manera, la inhibición del proteosoma no recuperó los niveles basales de VP1, sin embargo, los niveles de proteínas virales tanto tempranas como tardías se redujeron significativamente, sugiriendo que la actividad del proteosoma es necesaria durante la infección. Estos resultados nos permitieron hipotetizar la existencia de un factor celular con la capacidad de restringir la traducción viral que es degradado vía proteosomal durante el ciclo de replicación. La inhibición del proteosoma permite la acumulación del factor celular que se contrapone a la

infección y se impide traducción del subgenoma viral, lo que obstaculiza la detección de la vía de degradación de VP1.

Abstract

Eleven genera integrate the *Caliciviridae* family; within them are agents of livestock, veterinary, and public health importance. Its members are nonenveloped viruses with an icosahedral capsid and nonsegmented, positive, and single-stranded RNA genomes.

The study of the molecular biology of the members of the *Caliciviridae* family has been possible through the study of mainly two family members: the *Feline calicivirus* (FCV) and the *Murine norovirus* (MNV). Many groups have stressed the relevance of distinct cellular proteins for viral genome replication and translation. The present work focused on the role of Hsp90 during the FCV replicative cycle. We first demonstrated that Hsp90's expression levels remain unchanged during infection and that a significant reduction of viral titers follows its inhibition with geldanamycin (GA). Our results suggest that the main effect of Hsp90's inhibition is a decrease in the major protein capsid (VP1) levels, which agreed with previous reports from other groups that identified MNV's VP1 as a protein client of Hsp90. To validate this, we assessed VP1-Hsp90 interaction through a proximity ligation assay and observed a direct interaction between Hsp9-VP1, which indicates that FCV's VP1 is a client protein of Hsp90. Thus, we intended to determine the VP1 degradation pathway. Our results demonstrate that the autophagy pathway is not involved in VP1's degradation since its inhibition did not restore its basal levels.

Similarly, when proteasome activity was inhibited, VP1's levels were not restored, and surprisingly, early and late viral protein levels were significantly reduced. These results allowed us to hypothesize the existence of a cellular protein that hinders viral translation and that must be degraded through the proteasomal pathway during the viral replication cycle. Therefore, by inhibiting proteasome activity, the accumulation of this cellular protein hinders subgenomic RNA translation and, thus, hampers the identification of VP1's degradation route.

Introducción

La clasificación de Baltimore divide a los virus en siete clases de acuerdo con el tipo de genoma y la forma en la que se replican. Los virus de la familia *Caliciviridae* son virus sin envoltura lipídica y pertenecen a la clase 4 de Baltimore, en la cual se incluyen virus con genoma de una sola molécula de RNA de polaridad positiva (ssRNA⁺) no segmentado. El genoma de los calicivirus tiene entre 6.4 a 8.5 kb de longitud y se encuentra dentro de una cápside icosaédrica de 27-40 nm de diámetro (Baltimore 1971, Lee, Chung *et al.* 2017, Vinje, Estes *et al.* 2019).

Los virus pertenecientes a la familia *Caliciviridae* provocan infecciones especie específicas; dentro de ella existen hasta ahora once géneros; siete albergan miembros que infectan mamíferos (*Lagovirus*, *Norovirus*, *Nebovirus*, *Recovirus*, *Sapovirus*, *Valovirus* y *Vesivirus*); dos más están compuestos por virus que infectan aves (*Bavovirus* y *Nacovirus*), y otros dos por virus que infectan peces (*Minovirus* y *Salovirus*); no obstante, se han identificado recientemente miembros de la familia que infectan anfibios y reptiles que aún no se han clasificado (Vinje, Estes *et al.* 2019).

Calicivirus felino

El *Calicivirus felino* (FCV), pertenece al género *Vesivirus* y es un modelo excelente para el estudio de la biología de los calicivirus. Este virus fue aislado por primera vez en 1957 (Fastier 1957) y es un virus que se propaga fácilmente *in vitro*, con un tropismo muy marcado por células epiteliales de origen felino (Sosnovtsev y Green 2003). Aunado a lo anterior, tanto la existencia de al menos un sistema de genética reversa desde 1995 y la descripción de receptores proteicos funcionales (Sosnovtsev y Green 1995, Makino, Shimojima *et al.* 2006, Stuart y Brown 2007), han contribuido a facilitar el estudio de su biología. Por un lado, los sistemas de genética reversa proveen de una plataforma experimental donde se “revierte” el Dogma Central (que va de gen a proteína), por lo que es una herramienta molecular muy valiosa para entender la relación entre gen y fenotipo (Chen, Liu *et al.* 2022). En tanto que la identificación de receptores virales es

esencial para el entender el tropismo tisular y la patogénesis viral (Grove y Marsh 2011).

La partícula viral de FCV

La austeridad del genoma de virus no envueltos como el FCV, los obliga a utilizar proteínas idénticas para formar su cápside (Caspar y Klug 1962, Morais 2016) y la utilización de subunidades de construcción idénticas, da lugar a estructuras altamente simétricas (Morais 2016). En los virus, la conformación poliédrica más común es la icosaédrica (Twarock y Luque 2019). El icosaedro es una figura geométrica con veinte lados (o caras), cada una compuesta por un triángulo equilátero, doce vértices y treinta aristas, que corresponden con los ejes de simetría rotacional de orden tres, cinco y dos que se observan en un icosaedro (**Figura 1**) (Johnson y Speir 1997).

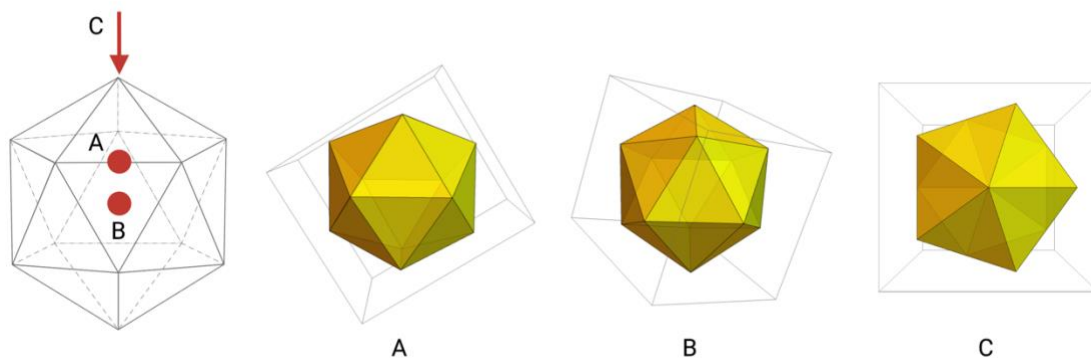


Figura 1 Ejes de simetría de un icosaedro.

Un icosaedro tiene quince ejes de simetría de orden dos, éstos ocurren cuando el eje de simetría atraviesa el centro de una arista hasta la arista opuesta (A). Cuando el eje de simetría atraviesa el baricentro de un par de caras opuestas, se forma un eje de simetría de orden tres (B). Cuando el eje de simetría une vértices opuestos se forman los ejes de simetría de orden cinco (C). En virología, el conocimiento de esta terminología es útil para describir interacciones que ocurren entre la partícula viral y la superficie de la célula (Louten 2016).

Cada cara del icosaedro está formada por al menos tres proteínas estructurales virales y la subunidad que éstas forman se conoce como unidad estructural. El número de unidades estructurales que conforman cada una de las

caras del icosaedro se define como número de triangulación o número T (**Figura 2**) (Louten 2016).

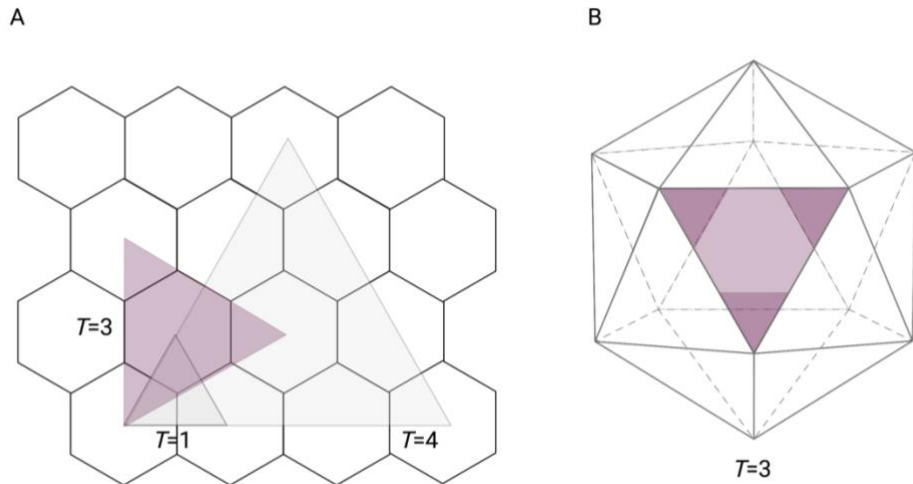


Figura 2 Arquitectura de la cápside viral basada en la teoría de Caspar y Klug.

A. Se muestran en la cuadrícula hexagonal uno de los triángulos del marco icosaédrico que se puede construir con números de triangulación 1, 3 y 4. B. Se observa el icosaedro construido con $T=3$ (Twarock y Luque 2019).

Las partículas virales de los calicivirus son icosaédricas con un número de triangulación de tres ($T=3$), en estos casos, son tres unidades totales las que forman cada cara del icosaedro; sin embargo, esto sucede a partir de seis medias unidades de manera que la mitad de cada unidad estructural forma parte de una cara adyacente (**Figura 2**) (Louten 2016). La simetría $T=3$ del FCV resulta en dos tipos de capsómeros (subunidades morfológicas de la cápside): los que se encuentran alrededor del eje de simetría de orden cinco están compuestos por monómeros de VP1 en dos conformaciones cuasiequivalentes que se denominan A y B; mientras que en los ejes de simetría de orden dos, los monómeros de VP1 se encuentran en posiciones equivalentes denominadas con la letra C (Bhella, Gatherer *et al.* 2008). La denominación de las subunidades de los capsómeros sigue la nomenclatura establecida para las cápsides icosaédricas de virus de RNA (Rossmann y Johnson 1989).

La partícula viral del FCV, así como la del resto de los calicivirus, es icosaédrica y mide entre 27 y 40 nm de diámetro. Está compuesta por ciento

ochenta copias de la proteína mayoritaria de la cápside VP1 y escasas copias de la proteína minoritaria de la cápside VP2 (**Figura 3**, panel A) (Neill 2002, Burmeister, Buisson *et al.* 2015). Se estima que el nivel de expresión de la proteína VP2 es de alrededor del 10% del nivel de expresión de VP1, y esta diferencia se debe a una regulación que ocurre a nivel de la traducción (Herbert, Brierley *et al.* 1996, Pöyry, Kaminski *et al.* 2007).

A pesar de su reducido número de copias, VP2 es esencial para la formación de partículas virales infecciosas (Sosnovtsev, Belliot *et al.* 2005), ya que es la encargada de permitir la salida del genoma viral al citoplasma de la célula hospedera a través de una estructura similar a un portal conformada por doce copias de VP2 que se ordenan en uno de los planos de simetría de orden 3 (**Figura 3**, panel B) (Conley, McElwee *et al.* 2019).

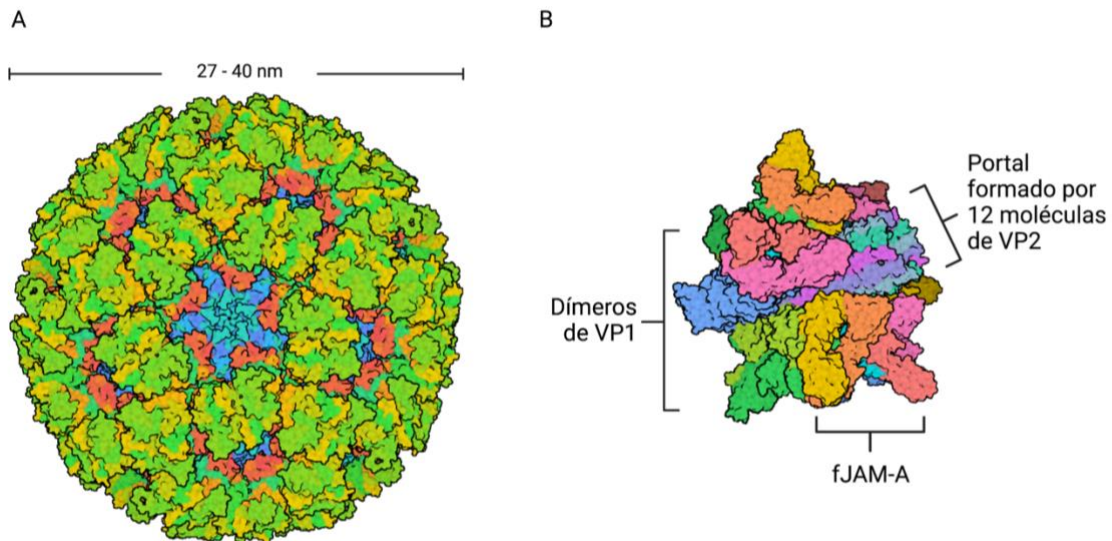


Figura 3 Partícula viral de FCV.

A. Muestra una reconstrucción icosaédrica en tres dimensiones de la partícula viral de FCV que tiene un diámetro de 27 - 40 nm [PDB ID: 3M8L]. B. Se muestran la interacción entre los dímeros de VP1 (verde y azul) con la proteína fJAM-A (amarillo-naranja-rosa) que permiten la formación de una estructura similar a un portal compuesto por doce copias de la proteína VP2 (morado-cyan-rosa) que se inserta en la membrana endosomal y permite la salida del genoma viral al citoplasma celular [PDB ID:6GSI] (Conley, McElwee *et al.* 2019).

En el interior del virión se encuentran el genoma viral, una molécula de RNA (gRNA) de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 7.7 kb; el RNA subgenómico (sgRNA) también se encuentra dentro de las partículas virales; esta es una molécula de RNA de 2.4 kb que contiene los dos últimos marcos de lectura abiertos (ORFs) a partir de los que se traducen las proteínas virales tardías (Neill 2002).

Organización del genoma viral

El RNA genómico del FCV en su extremo 5' tiene unida de manera covalente a la proteína de origen viral VPg que actúa como un análogo del Cap de los mensajeros celulares, y el extremo 3' se encuentra poliadenilado (Wimmer 1982, Sosnovtsev y Green 1995). Tanto en el extremo 5' como en el 3' de los RNAs genómico y subgenómico existen regiones no traducidas (UTRs) en las cuales ocurren interacciones con proteínas celulares y virales reguladoras del ciclo de replicación (Alhatlani, Vashist *et al.* 2015). La región codificante del RNA genómico contiene tres marcos de lectura (ORF), el ORF1 (nucleótidos [nt] 20 - 5308) codifica una poliproteína que es procesada cotraduccionalmente por la proteinasa viral (NS6/7) para dar lugar a seis proteínas tempranas: NS1, NS2, NS3, NS4, NS5 y NS6/7 (Sosnovtseva, Sosnovtsev *et al.* 1999) (**Figura 4**). Basándose en similitudes con proteínas ortólogas de virus pertenecientes a la familia *Picornaviridae*, se identificó las funciones de la helicasa (NS3), de VPg (NS5) y de la proteasa/RNA polimerasa dependiente de RNA (NS6/7) (Smertina, Hall *et al.* 2021). La función del resto de las proteínas no estructurales está poco estudiada, pero se sabe que participan en el remodelamiento de membranas internas y en la formación de los complejos de replicación (NS1, NS2 y NS4); en otros miembros de la familia *Caliciviridae* se ha descrito la participación de NS1 en el tropismo tisular (Nice, Strong *et al.* 2013).

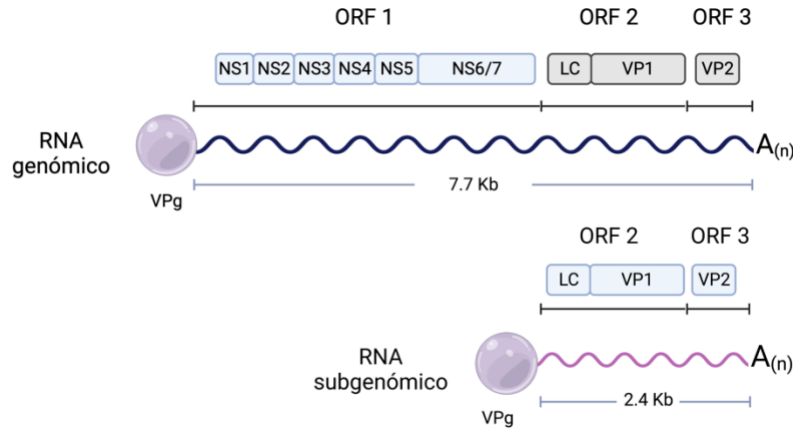


Figura 4 Organización genómica del FCV

El FCV tiene un genoma de RNA de una sola hebra, de polaridad positiva, con una longitud de 7.7 Kb. En el extremo 5' del RNA se encuentra unida covalentemente la proteína viral VPg y el extremo 3' está poliadenilado. En este RNA se encuentran tres marcos de lectura abiertos (ORFs): en el ORF1 se encuentran codificadas las proteínas tempranas (NS1-NS6/7). En el ORF2 se codifica a la proteína tardía LC y a la proteína mayoritaria de la cápside VP1, mientras que el ORF3 codifica solamente a la proteína minoritaria de la cápside VP2. Las proteínas tempranas se traducen del genoma mientras que las proteínas tardías lo hacen a partir de un RNA subgenómico que también está unido a VPg en su extremo 5' y está poliadenilado en su extremo 3' (Peñaflor-Téllez, Trujillo-Uscanga et al. 2019).

El sgRNA contiene dos ORFs que corresponden a los dos últimos presentes en el gRNA (ORF2: nt 5314 - 7317; ORF3: nt 7317 - 7634) (Sosnovtseva, Sosnovtsev et al. 1999); al igual que en el gRNA, en el extremo 5' se encuentra la proteína VPg unida covalentemente y el extremo 3' está poliadenilado. El ORF2 codifica a la proteína mayoritaria de la cápside VP1, que es traducida inicialmente como un precursor LC-VP1 que es escindido por la proteínasa viral (NS6/7) para dar lugar a la proteína VP1 madura de alrededor de 60 kDa y a la proteína Líder de la cápside (LC) de 14 kDa (Carter, Milton et al. 1992, Sosnovtsev, Sosnovtseva et al. 1998). LC ha sido asociada al establecimiento del efecto citopático típico de la infección por FCV (Abente, Sosnovtsev et al. 2013) y ha sido caracterizada como una viroporina por nuestro grupo de investigación ya que cuenta con una firma molecular de defensina y en un contexto libre de virus forma homooligómeros a través de puentes disulfuro y es intrínsecamente tóxica (Peñaflor-Téllez, Chávez-Munguía et al. 2022); sin embargo, el papel que desempeña durante la infección por el FCV aún está siendo caracterizado. El ORF3 codifica a la proteína minoritaria

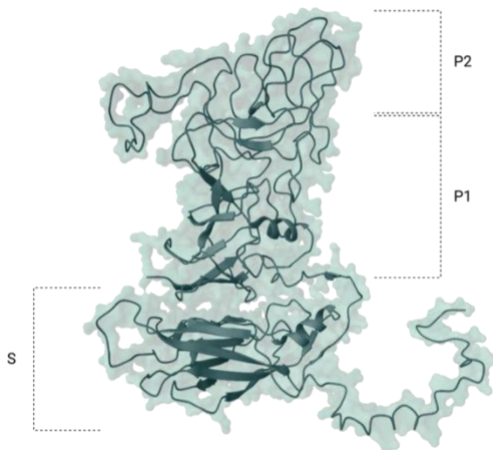


Figura 5 Proteína mayoritaria de la cápside.

La proteína VP1 se puede dividir estructuralmente en dos dominios: S (shell) y P (protruding). El dominio P es flexible y se subdivide en dos subdominios: P1 y P2, en éste último se encuentra el sitio de unión a la proteína JAM-A y los epítomos principales. [PDB ID: 3M8L]

regiones (A-F), la región A corresponde a LC, las regiones B, D y F corresponden a VP1 y son conservadas entre aislados de FCV; las regiones C y E son altamente variables y la región E se subdivide aún en dos regiones hipervariables E5'HVR y E3'HVR (Cubillos-Zapata, Angulo *et al.* 2020). Se desconoce si el precursor de VP1 desempeña alguna función durante el ciclo de replicación; sin embargo, dada la austeridad del genoma del FCV y la detección de los precursores de las proteínas tempranas en células infectadas es probable que desempeñen una función aún no caracterizada durante el ciclo de replicación al igual que ocurre en otros virus de RNA como los picornavirus (Sosnovtseva, Sosnovtsev *et al.* 1999, Pathak, Oh *et al.* 2008). Estructuralmente, la proteína se divide en dos dominios, un dominio S que se puede considerar interno porque queda dentro de la partícula viral, y un dominio P que protruye de la superficie de la cápside y forma una estructura arqueada que da a las partículas virales su morfología característica (Bhella, Gatherer *et al.* 2008) (**Figura 5**). El dominio P se divide en dos subdominios: P1 y

de la cápside VP2, de 12.2 kDa que, a pesar de estar presente en un número bajo de copias en la cápside viral, tiene un papel esencial en la liberación del RNA genómico viral al citoplasma de su célula hospedera (Sosnovtsev, Belliot *et al.* 2005, Conley, McElwee *et al.* 2019).

Proteína mayoritaria de la cápside

La proteína VP1 se traduce a partir del ORF2 como un precursor de alrededor de 73 - 78 kDa que necesita ser procesado por la proteínasa viral para dar lugar a VP1 y a LC (Sosnovtseva, Sosnovtsev *et al.* 1999). Antigénicamente este precursor se puede dividir el precursor en seis

P2; P2 corresponde a la región más expuesta de la partícula viral y donde se encuentra el sitio de unión al receptor fJAM-A (*feline Junctional Adhesion Molecule*), así como los epítomos principales de la partícula viral (Conley, McElwee *et al.* 2019, Cubillos-Zapata, Angulo *et al.* 2020).

El ciclo de replicación

Entrada al citoplasma celular

El ciclo de replicación del FCV inicia cuando el virus interactúa con su receptor y ocurre la internalización de la partícula viral en un proceso mediado por clatrina (Stuart y Brown 2006). La interacción entre VP1 y fJAM-A ocurre entre el subdominio P2 de VP1 y el dominio D1 tipo inmunoglobulina de fJAM-A, lo que genera una rotación de aproximadamente 15° en sentido contrario a las manecillas de reloj y prepara a la cápside viral para la liberación del genoma (Bhella y Goodfellow 2011). Conforme el virión es envuelto en el endosoma, la cápside viral interacciona con un mayor número de moléculas de fJAM-A, se estima que una relación de 10:1 de moléculas de fJAM-A:VP1 es la mínima necesaria para desestabilizar la cápside viral y facilitar los rearrreglos estructurales de la cápside que llevan a la formación de una estructura similar a un portal formada por doce copias de VP2 (Conley, McElwee *et al.* 2019). La formación de esta estructura ocurre en un único vértice, en un plano de simetría de orden tres y culmina con la inserción del dominio N-terminal de las moléculas de VP2 en la membrana endosomal para formar un canal a través del cual el genoma viral es liberado al citosol (Conley, McElwee *et al.* 2019).

Traducción del RNA

Al entrar al citoplasma, el genoma viral es traducido y a diferencia de otros virus de ssRNA⁺, el inicio de la síntesis de proteínas no depende de un 5'-Cap ni de un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES), sino que es mediada por la proteína viral VPg unida covalentemente al extremo 5' del genoma a través de su tirosina-24 (Mitra, Sosnovtsev *et al.* 2004). Para dar inicio a la traducción del genoma viral,

VPg interactúa directamente con el eIF4F, un factor celular canónico del inicio de la traducción que está constituido por las proteínas eIF4A, eIF4E y eIF4g, es necesaria para dar inicio a la traducción del genoma viral (Goodfellow, Chaudhry *et al.* 2005). Al igual que en el gRNA, la traducción del ORF2 del sgRNA depende de la interacción de VPg con eIF4F, en tanto que la traducción del ORF3 ocurre a través de un mecanismo de terminación/reinicio de la traducción y es totalmente dependiente de la traducción del ORF2 (Luttermann y Meyers 2007, Pöyry, Kaminski *et al.* 2007). El cambio de traducción a replicación es regulado por proteínas del huésped, una de ellas es la proteína de unión al tracto de polipirimidina (PTB) localizada principalmente en el núcleo, pero que se relocaliza al citoplasma ante diferentes estímulos, incluyendo las infecciones virales. PTB se une al extremo 5' del gRNA del FCV y funciona como un represor de la traducción para permitir la replicación del genoma viral (Karakasiliotis, Vashist *et al.* 2010).

Replicación del RNA

Como en otros virus ssRNA⁺, el ciclo de replicación del FCV induce una extensa reorganización de membranas celulares para la formación de complejos de replicación o fábricas virales (Love y Sabine 1975) y estos parecen proceder del Retículo Endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi (Green, Mory *et al.* 2002). Aunque el proceso de formación de los complejos no está totalmente descrito, se sugiere la participación de las proteínas virales tempranas NS2, NS3 y NS4, debido a que cuentan con dominios transmembranales y durante la infección se localizan en el RE (Bailey, Kaiser *et al.* 2010).

La RNA polimerasa dependiente de RNA (Pro/Pol o NS6/7 en el FCV), inicia la replicación del genoma con la síntesis de una hebra antisentido, generando un intermediario de doble cadena (Rohayem, Robel *et al.* 2006, Olspert, Hosmillo *et al.* 2016). La replicación de la hebra de RNA antisentido ocurre *de novo*, cuando la Pro/Pol reconoce un estrecho de poli (C) en el extremo 3' del RNA, mientras que el inicio de la replicación del RNA genómico está mediado por el reconocimiento de la proteína VPg unida a la UTR3' que sirve como cebador para la Pro/Pol (**Figura 6**).

Para la síntesis de RNAs subgenómicos existen tres mecanismos descritos: en el primero, se requiere de la presencia interna de un sitio promotor del subgenoma en una hebra de RNA de sentido negativo que sirve como plantilla; en el segundo mecanismo, la síntesis de la hebra de RNA de sentido negativo termina de manera prematura y sirve como molde para la síntesis del sgRNA; el tercer mecanismo involucra una síntesis discontinua de la molécula de RNA de sentido negativo, generando así la plantilla de sentido negativo que servirá para la producción del sgRNA (Sztuba-Solińska, Stollar *et al.* 2011).

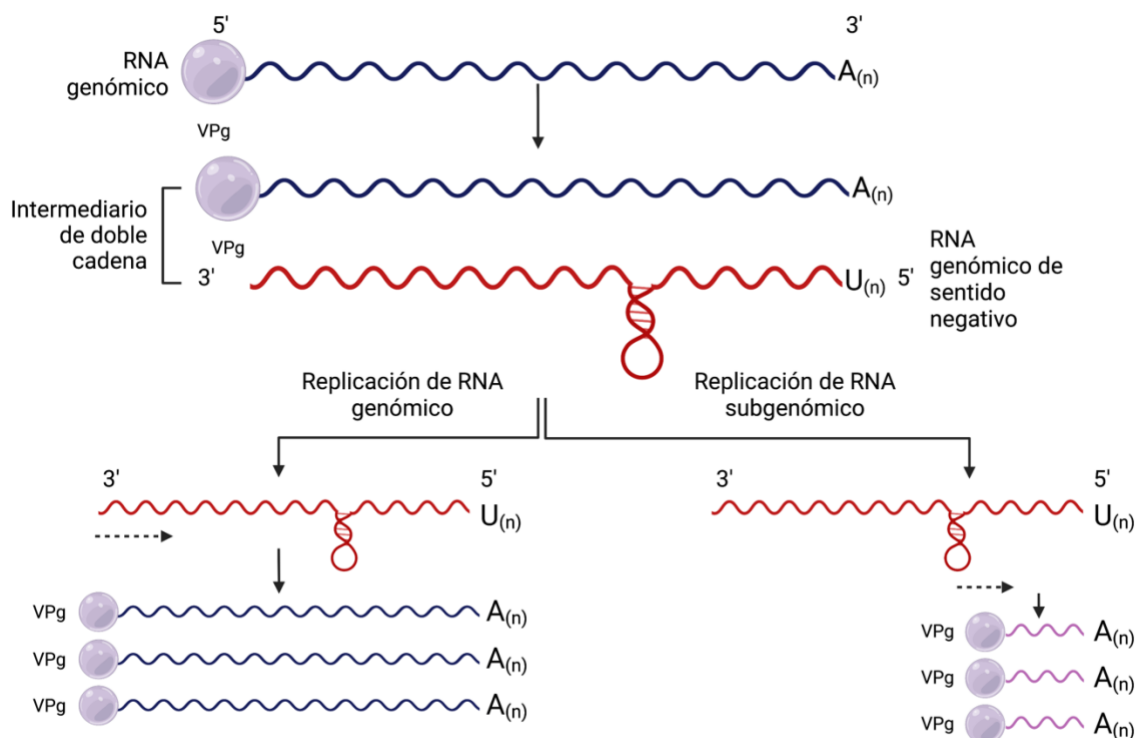


Figura 6 Replicación del RNA genómico y del RNA subgenómico.

La replicación del genoma viral ocurre a través de un RNA antisentido con la longitud completa del genoma, esto genera un intermediario de doble cadena. La replicación de la hebra antisentido ocurre de novo cuando la polimerasa reconoce un estrecho de poli (C) que se agrega por la actividad de transferasa terminal de la polimerasa en la región 3' del RNA. El inicio de la replicación de la hebra de sentido positivo ocurre cuando la polimerasa reconoce a la proteína VPg unida en el extremo 3'UTR. La replicación del RNA subgenómico se ha sugerido que ocurre por la presencia de una estructura secundaria de RNA de tallo-burbuja que sirve como promotor interno y que es reconocido por la polimerasa viral para dar lugar al subgenoma viral, se ha propuesto que los subgenomas de sentido positivo sirven como molde para rondas posteriores de replicación (Yunus, Lin *et al.* 2015). Revisado en: (Smertina, Urakova *et al.* 2019).

El mecanismo que parecen utilizar los miembros de la familia *Caliciviridae* es el primero (**Figura 6**). En todos los calicivirus estudiados existe una estructura secundaria conservada de tallo-burbuja en la hebra antisentido del gRNA, exactamente 6 nt antes del inicio del sgRNA (Simmonds, Karakasiliotis *et al.* 2008). Mutaciones que derivan en la pérdida de la estructura de tallo-burbuja impiden la recuperación de partículas virales infecciosas hasta que se acumulan suficientes mutaciones como para recuperar la formación de la estructura secundaria (Yunus, Lin *et al.* 2015). La estructura secundaria es reconocida por el complejo de replicación y sintetiza el sgRNA, no obstante, se puede recuperar el sgRNA de sentido negativo en células infectadas, lo que se considera un sello del segundo mecanismo de producción de sgRNA; para explicarlo se ha propuesto que la molécula de sgRNA de sentido positivo que se sintetiza sirve como plantilla para rondas adicionales de replicación, esta hipótesis se apoya en que las cantidades detectadas de sgRNA son mucho mayores que las del gRNA, lo cual ha sido observado tanto en el FCV y como en el MNV (Green, Mory *et al.* 2002, Yunus, Lin *et al.* 2015).

Encapsidación del genoma viral

El proceso de encapsidación de los calicivirus no está descrito por completo; sin embargo, se ha especulado que la interacción entre VPg, NS6/7, VP2 y VP1 es esencial para que se lleve a cabo (Kaiser, Chaudhry *et al.* 2006). Se ha propuesto que la encapsidación del genoma viral ocurre cuando los niveles de VP1 dentro de la célula infectada alcanzan un umbral de oligomerización; se especula que estos oligómeros pueden ser estabilizados por la proteína VP2 que al mismo tiempo se ha sugerido que está encargada de mediar la interacción entre el RNA viral y la cápside en formación (Vongpunsawad, Venkataram Prasad *et al.* 2013).

En etapas tardías de la infección por diferentes miembros de la familia *Caliciviridae*, se induce la apoptosis por vía intrínseca (Sosnovtsev, Prikhod'ko *et al.* 2003); se ha sugerido que la apoptosis en etapas tardías permite la producción eficiente de progenie viral así como la evasión de la respuesta inmune y la diseminación dentro del hospedero (Teodoro y Branton 1997). Aunque se ha

observado que la transfección de la proteína LC de FCV a células CrFK induce apoptosis, aún no está claro qué proteína viral es la responsable de la inducción de apoptosis durante la infección (Barrera-Vázquez, Cancio-Lonches *et al.* 2019).

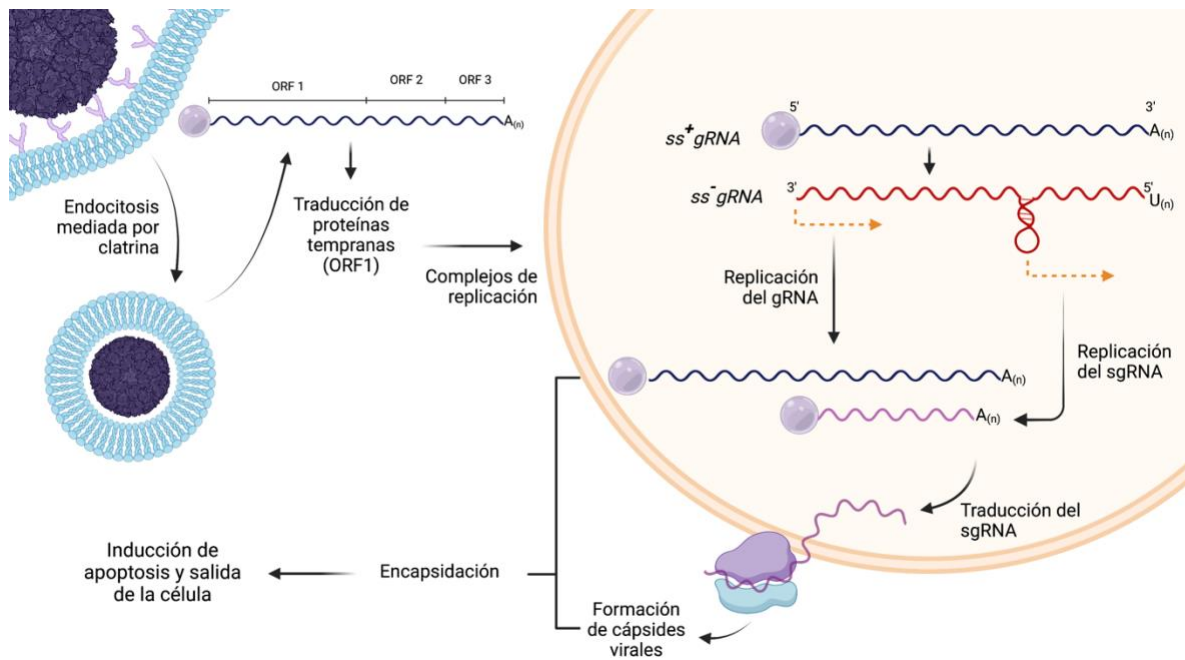


Figura 7 Ciclo de replicación del FCV.

El ciclo de replicación del FCV inicia cuando el subdominio P2 de la proteína VP1 interactúa con el receptor funcional fJAM-A (Makino, Shimojima *et al.* 2006, Stuart y Brown 2007); esta interacción inicia la endocitosis mediada por clatrina de la partícula viral (Stuart y Brown 2006). Conforme la partícula viral es envuelta en el endosoma, la interacción de moléculas de fJAM-A con moléculas de VP1 (relación 10:1) (Conley, McElwee *et al.* 2019), desestabiliza la cápside viral y promueve la formación de una estructura similar a un portal formada por doce moléculas de VP2 que permite la salida del virus al citoplasma celular (Conley, McElwee *et al.* 2019). Una vez en el citoplasma, la proteína VPg interactúa con factores canónicos de la traducción como eIF4F e inicia la traducción del ORF1 (Chaudhry, Nayak *et al.* 2006). Las proteínas tempranas codificadas en el ORF1 promueven la formación de complejos de replicación donde se lleva a cabo la replicación del RNA viral a través de un intermediario de cadena negativa que da lugar al genoma viral completo y a un RNA subgenómico a partir del que son traducidas las proteínas virales tardías (Smertina, Urakova *et al.* 2019); cuando se alcanza el umbral de oligomerización de VP1, inicia el autoensamblaje de partículas virales (Vongpunsawad, Venkataram Prasad *et al.* 2013). Para salir de la célula, el FCV induce apoptosis a través de la vía intrínseca y se disemina dentro de su hospedero (Sosnovtsev, Prikhod'ko *et al.* 2003).

El mantenimiento de un genoma viral infeccioso aún bajo condiciones extremas de temperatura depende de la cápside viral; cada proteína estructural, de los cientos de miles que el virus produce, debe adoptar una conformación precursora que sea soluble y miles de estas unidades proteicas deben ser

ensambladas de manera ordenada, por lo que no resulta extraño que para hacerlo, dependa en gran medida de las chaperonas celulares o proteínas de choque térmico (Geller, Taguwa *et al.* 2012, Vashist, Urena *et al.* 2015).

Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico (Hsp por sus siglas en inglés Heat shock proteins), fueron descubiertas por Ferruccio Ritosa al exponer a altas temperaturas a larvas de *Drosophila busckii* (Ritosa 1962); la exposición al calor le permitió observar lo que él llamó “puffing patterns” en los cromosomas de *Drosophila* que correspondía a una respuesta génica al estrés térmico. Las proteínas de choque térmico se expresan en las células de todos los organismos estudiados a la fecha y representan los factores de adaptación más importantes a las condiciones ambientales adversas (Lindquist 1986, Hoter, El-Sabban *et al.* 2018). Estas proteínas representan alrededor del 1-2% del total de proteínas de una célula en estado normal y su abundancia puede aumentar a 6% o más en condiciones de estrés (Yim, Prince *et al.* 2016). Las Hsps también son conocidas como chaperonas moleculares ya que se encargan del plegamiento correcto de proteínas recién sintetizadas, de la termotolerancia, del ensamblaje y desensamble de complejos macromoleculares y de la reestructuración de proteínas mal plegadas (Taipale, Jarosz *et al.* 2010, Lackie, Maciejewski *et al.* 2017, Schopf, Biebl *et al.* 2017). Sin embargo, están involucradas de igual manera en la regulación del sistema de ubiquitina-proteosoma, la vía principal de eliminación de proteínas mal plegadas con que cuentan las células eucariontes (McClellan, Tam *et al.* 2005, Taipale, Jarosz *et al.* 2010), así como con la maquinaria de traslocación de polipéptidos, es decir, aseguran la correcta localización subcelular de sus proteínas blanco (Young, Hoogenraad *et al.* 2003, Taipale, Jarosz *et al.* 2010). Las Hsps se clasifican en seis familias principales de acuerdo con su peso molecular: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 y las Hsp pequeñas, cuyos pesos moleculares oscilan entre 12 y 43 kDa (Bakthisaran, Tangirala *et al.* 2015).

Hsp90

La familia de chaperonas Hsp90 es una de las más abundantes y conservadas evolutivamente; se han descrito miembros de la familia de Hsp90 en todos los reinos, excepto en *Archaea* (Chen, Zhong *et al.* 2006). En eucariontes superiores existen cuatro parálogos, las dos formas principales Hsp90 α y Hsp90 β se localizan en el citoplasma, la primera es inducible y la última se expresa de manera constitutiva. En el RE reside la Grp94 (proteína regulada por glucosa de 94 kDa), mientras que en mitocondria se encuentra la TRAP1 (proteína 1 asociada a receptor de factor de necrosis tumoral) y en cloroplastos la Hsp90C (Ostrovsky, Makarewich *et al.* 2009, Mayer y Le Breton 2015, T. Gewirth 2016). Todos los parálogos funcionan como homodímeros y cada protómero está compuesto por tres dominios consecutivos: el dominio amino-terminal (NTD), donde reside la actividad de ATPasa; el dominio medio (MD), donde se ha reportado la mayor cantidad de interacciones directas con sus proteínas cliente y, el dominio carboxilo-terminal (CTD), que es dominio de dimerización (Richter y Buchner 2011, Yim, Prince *et al.* 2016, Giannoulis, Feintuch *et al.* 2020) (**Figura 8**).

La lista actual de las proteínas cliente de Hsp90 incluye receptores, factores de transcripción y cinasas, entre otras, que no comparten características comunes en términos de secuencia, ya que, a diferencia de otros sistemas de chaperonas, Hsp90 parece reconocer elementos metaestables en sus clientes, con los que interactúa en un ciclo dependiente de ATP (Geller, Taguwa *et al.* 2012, Mayer y Le Breton 2015). La lista actualizada de las proteínas cliente de Hsp90 es mantenida por el laboratorio del doctor Picard y se puede consultar en la dirección: <https://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>.

A diferencia de otros sistemas de chaperonas, Hsp90 generalmente no está encargada de devolver a su estado nativo a proteínas mal plegadas, sino que recibe a sus proteínas cliente en un estado cercano al nativo de otros sistemas de chaperonas como el de Hsp70 o el de la cochaperona Cdc37, de manera que la especificidad por sus proteínas clientes depende en parte, de sus cochaperonas (Geller, Taguwa *et al.* 2012, Mayer y Le Breton 2015).

Los avances en el entendimiento de la función de Hsp90 se deben, en gran parte, al descubrimiento de agentes farmacológicos que inhiben específicamente su función (Taldone, Sun *et al.* 2009). El primer compuesto inhibitorio descubierto de Hsp90 fue geldanamicina (GA), una bezonquinona aislada a partir de *Streptomyces hygroscopicus* en 1970 (DeBoer, Meulman *et al.* 1970, Sasaki, Eguchi *et al.* 1970). La actividad antineoplásica de GA fue evidente desde su primera descripción (DeBoer, Meulman *et al.* 1970), y como inhibe la actividad de la tirosinacinas transformada v-src, se creyó que era un inhibidor específico de cinasas (Yamaki, Nakajima *et al.* 1995). Sin embargo, cuando se realizó un entrelazamiento químico de GA con perlas de sefarosa se demostró que no tiene interacción directa con ninguna cinasa, sino que se une de manera altamente específica a Hsp90 (Whitesell, Mimnaugh *et al.* 1994, T. Gewirth 2016). Estudios posteriores demostraron que GA se une de manera competitiva y reversible al sitio de unión de ATP en el dominio NDT de Hsp90, inhibiendo su actividad de ATPasa que es esencial para su actividad de chaperona (**Figura 8**)(Grenert, Sullivan *et al.* 1997, Panaretou, Prodromou *et al.* 1998). La identificación de la molécula blanco de GA permitió la descripción de cientos de proteínas cuya función biológica depende de Hsp90, lo que permitió a su vez, probar el hecho de que la actividad de Hsp90 como chaperona es muy amplia (T. Gewirth 2016). En la mayor parte de los casos, la inhibición de la actividad de Hsp90 lleva a la degradación de sus proteínas cliente por el sistema de ubiquitina-proteosoma (Theodoraki y Caplan 2012).

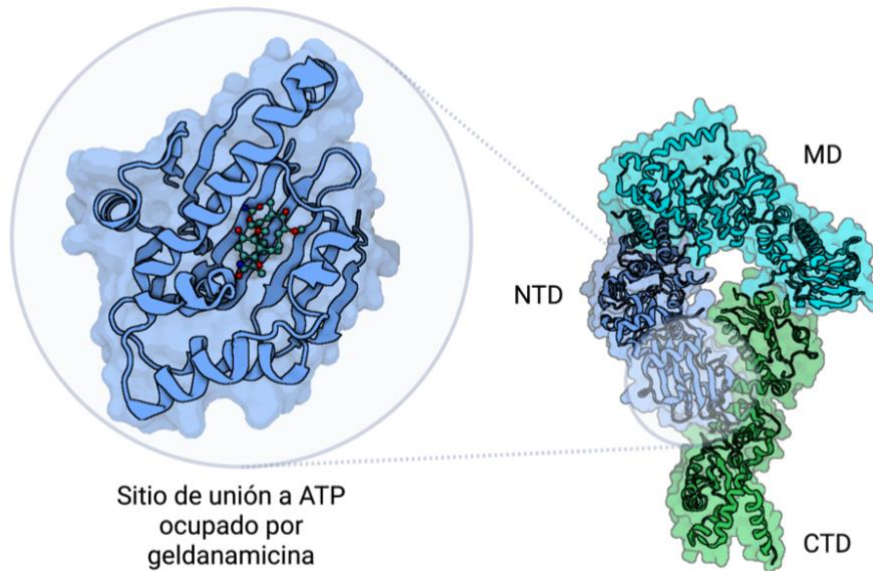


Figura 8 Dominios de la proteína Hsp90.

La proteína Hsp90 está constituida por tres dominios, en azul oscuro se observa el dominio amino-terminal (NTD), el dominio medio (MD) que se muestra en cian y el dominio carboxilo-terminal (CTD) que se observa en verde. La unión a ATP y por lo tanto su función como chaperona puede ser inhibida con el uso de drogas que se unen de manera competitiva al dominio de unión a ATP. Geldanamicina fue el primer inhibidor específico de Hsp90 en ser descrito (Grenert, Sullivan *et al.* 1997). Proteína completa Hsp90 [PBD ID: 3Q6M], Dominio amino-terminal unido a geldanamicina [PBD ID: 1YET].

Hsp90 y proteínas virales

Hsp90 es el sistema de chaperonas más estudiado en el contexto de infecciones virales. Considerando la complejidad general de las cápsides virales, las proteínas que las forman, son especialmente dependientes de las chaperonas celulares (Geller, Taguwa *et al.* 2012, Aviner y Frydman 2020). Se ha demostrado, por ejemplo, que Hsp90 participa en la maduración de las proteínas de la cápside de miembros de la familia *Picornaviridae* (poliovirus, rinovirus y coxsackievirus), en los que la inhibición de Hsp90 por GA, lleva a la degradación proteosomal de la proteína de la cápside P1 (Geller, Vignuzzi *et al.* 2007).

De las proteínas no estructurales, las polimerasas virales son los clientes principales de Hsp90 a pesar de su divergencia funcional, estructural y evolutiva (Geller, Taguwa *et al.* 2012). Por ejemplo, durante la infección con Herpes simple tipo 1 (HSV-1), un virus con genoma de doble cadena de DNA, Hsp90 está

involucrada en la localización nuclear de la polimerasa (Burch y Weller 2004). En la infección por Influenza A, un virus con genoma de ssRNA- cuya polimerasa está compuesta de 3 subunidades (PB1, PB2 y PA), la inhibición de Hsp90 lleva a la reducción de la vida media de las subunidades PB1 y PB2 e inhibe el importe nuclear de PB1 y PA, lo cual resulta en la disminución del ensamblaje de su complejo de replicación (Chase, Deng *et al.* 2008). En el virus de las paperas (MuV), virus con un genoma de ssRNA-, se requiere de la actividad de Hsp90 para la síntesis de la proteína L (que alberga los residuos catalíticos requeridos para la síntesis de RNA), así como para la formación del complejo de RNA polimerasa activo (Kato, Kubota *et al.* 2017).

Hsp90 en la familia *Caliciviridae*

Durante la infección por MNV-1, utilizando cromatografía de afinidad de RNA y espectrometría de masas, se identificaron numerosos factores celulares que interaccionan con las estructuras secundarias de RNA conservadas en los extremos 5' y 3' del gRNA y sgRNA entre los que destaca la detección de las dos isoformas principales, α y β de Hsp90 (Vashist, Urena *et al.* 2012). Mediante la técnica de reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-qPCR) se detectó que al impedir la actividad de Hsp90 con el inhibidor específico 17-DMAG (Alvespimicina), se ocasionó una disminución significativa de la cantidad de RNA viral así como una disminución muy significativa (alrededor de tres órdenes de magnitud en la escala logarítmica) de la expresión tanto de VP1 como de VP2 (Vashist, Urena *et al.* 2015). Con estos resultados, se propuso que VP1 del MNV es una proteína cliente de Hsp90 y que la acción de ésta es necesaria para la producción eficiente de partículas virales infectivas, es decir para la encapsidación del genoma; sin embargo, la inhibición del proteosoma y la autofagia no restauran los niveles basales de VP1, por lo que queda en duda si el papel de Hsp90 es el de proteger a VP1 de ser degradada. Por otra parte, como Hsp90 interactúa con el genoma viral, se propuso que pudiera estar encargada de reclutar a VP1 para iniciar la encapsidación viral; sin embargo, esta hipótesis queda por comprobarse. Aunque la proteína VP1 del MNV-1 y del norovirus de humano son clientes de Hsp90,

se desconoce el papel de esta proteína en el ciclo de replicación en miembros del género *Vesivirus* (Vashist, Urena *et al.* 2015).

Nuestro equipo de trabajo inició el estudio del papel de las proteínas Hsp90 en la replicación del FCV, habiendo demostrado que la infección no modula su expresión. Además, utilizando geldanamicina como inhibidor de su actividad, se identificó la participación de Hsp90 en el mantenimiento de una replicación viral eficiente, ya que el inhibidor retrasó significativamente el establecimiento del efecto citopático y redujo de notablemente la producción de progenie viral (Palafox 2015). Asimismo, mediante microscopía confocal se observó una reducción de la intensidad media de fluorescencia correspondiente a la proteína VP1 en presencia del inhibidor GA, lo que sugiere que la inactivación de Hsp90 repercute en la estabilidad de la proteína viral VP1. Todo lo anterior apoya la probable participación de la proteína Hsp90 en los eventos tardíos de la replicación del FCV. No obstante, se desconoce el mecanismo molecular subyacente.

Justificación

Debido a la falta de un cultivo eficiente de los norovirus que infectan humanos, el estudio de la biología de la familia *Caliciviridae* depende del estudio de otros de sus miembros, como el *Calicivirus felino* (FCV). Utilizando este modelo de estudio, nuestro grupo de trabajo demostró que la inhibición de la actividad de Hsp90 correlaciona con una reducción en la producción de la proteína viral VP1, similar a lo reportado en otros miembros de la familia *Caliciviridae*, sin embargo, se desconoce el mecanismo subyacente. Determinar el papel que desempeña Hsp90 en la replicación del FCV, permitirá contribuir con la identificación de las moléculas celulares de las que depende su replicación y con ello, entender mejor su biología.

Hipótesis

La proteína Hsp90 participa en el ciclo de replicación de *Calicivirus felino*.

Objetivo general

Identificar los procesos del ciclo de replicación del FCV en los que participe la proteína Hsp90.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la inhibición de la actividad de Hsp90 sobre la producción de la progenie viral.
2. Evaluar la asociación de Hsp90 con VP1 durante la infección del FCV.
3. Evaluar la actividad de Hsp90 en la producción y/o estabilidad de proteínas virales.
4. Determinar la vía de degradación de la proteína VP1 en ausencia de actividad de Hsp90.

Materiales y métodos

Células y stock viral

Células Crandell Rees de riñón felino (CrFK (Crandell, Fabricant *et al.* 1973)), obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC) se mantuvieron en las condiciones recomendadas por la ATCC, es decir a 37°C, con atmósfera de aire y CO₂ al 5%. Se utilizó medio Medio Esencial Mínimo (MEM) Advance (Gibco, Estados Unidos), suplementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado con calor (16000-044, Gibco, Estados Unidos) al 7% v/v, 5000 U de penicilina y 5 µg/mL de estreptomicina. Las células CrFK, recientemente se clasificaron como mesenquimales (Lawson, Syme *et al.* 2019).

Las células tuvieron al menos 3 pasajes antes de utilizarse para ensayos y se mantuvieron hasta el pasaje 25 - 30. Una vez alcanzado este número, se descongelaron viales nuevos.

La cepa del FCV con la que se trabajó es Urbana, la cual se obtuvo a partir de la clona infecciosa pQ14 por la Dra. Beatriz Alvarado Hernández (Sosnovtsev y Green 1995). El título viral se obtuvo a partir de ensayos de plaqueo de acuerdo a como ha sido reportado con anterioridad (Escobar-Herrera, Medina-Ramirez *et al.* 2007).

Obtención de extractos totales y cuantificación de proteínas

La obtención de extractos totales se realizó de acuerdo con el protocolo para buffer de lisis para ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) de abcam; éste se puede encontrar en la siguiente liga: <https://www.abcam.com/protocols/sample-preparation-for-western-blot>.

El buffer RIPA se preparó de acuerdo con la receta del Cold Spring Harbor Laboratory que puede encontrarse en la siguiente dirección: https://cshprotocols.cshlp.org/content/2017/12/pdb.rec101428.full?text_only=true (NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1% [v/v], Desoxicolato de sodio [DOC] 0.5% [w/v], Dodecilsulfato sódico [SDS] 0.1% [w/v] y Tris 50mM ([pH 7.4]). Una vez obtenidos los extractos proteicos totales, se realizó la cuantificación de proteínas por el

método del ácido bicinonínico (BCA) (Pierce BCA Protein Assay Kit, 23225 [ThermoFisher SCIENTIFIC, EUA]) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción se mantuvo a 37° C durante una hora para aumentar la sensibilidad del ensayo, de acuerdo con las recomendaciones del manual del fabricante (**Figura 9**).

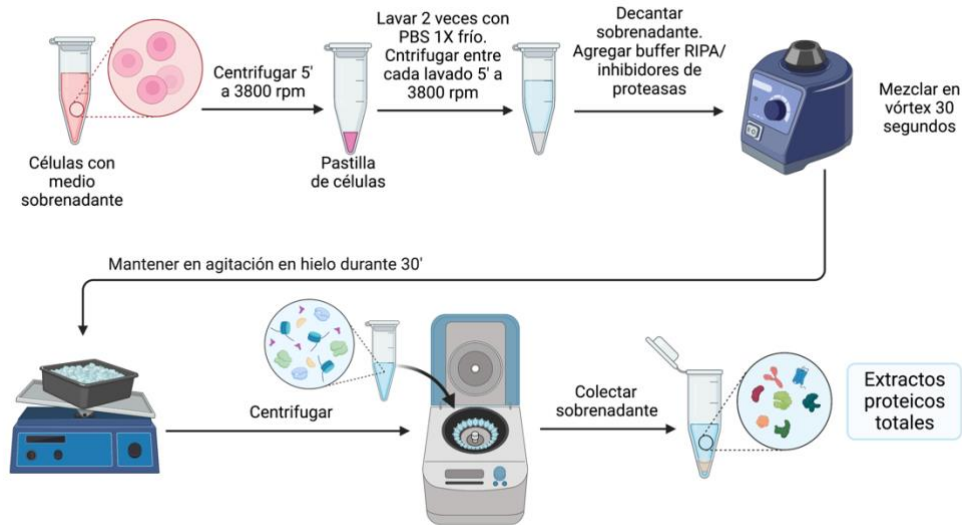


Figura 9 Obtención de extractos proteicos totales.

Las células se recolectaron mediante raspado y junto con el medio sobrenadante, se centrifugaron a 3800 rpm durante 5 min para obtener una pastilla de células. Se decantó el medio y la pastilla se lavó con PBS y se centrifugó nuevamente a 3800 rpm (1,400 x g) durante 5 min a 4° C (Centrifuga: Sorvall Legend Micro 21R, Thermo Scientific). Una vez lavada la pastilla, se agregó el buffer RIPA con los inhibidores de proteasas (mini cOmplete sin EDTA [Roche, Suiza]), EDTA (Sigma Aldrich, Alemania) a una concentración final de 10 mM y PMSF (Sigma, Alemania) a una concentración final de 1 mM. Cada muestra se mezcló vigorosamente en Vórtex y se dejó incubar en hielo, en agitación durante 30 min. Terminado este tiempo, se centrifugaron a 14000 rpm (21,100 x g) durante 20 min a 4° C y se recuperó el sobrenadante.

Título viral por ensayos de plaqueo

El plaqueo de FCV se realizó de acuerdo al método descrito anteriormente (Escobar-Herrera, Medina-Ramirez *et al.* 2007), de manera que se describe brevemente: de un vial de stock viral de 1 mL se realizaron diluciones seriadas base 10 desde 10⁻¹ hasta 10⁻¹⁰ en medio MEM Advance sin SFB. Posteriormente, duplicados de células CrFK en monocapa a una confluencia del 80% sembradas en

cajas Corning® de 12 pozos, se lavaron con buffer salino de fosfatos (PBS) 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂POH₄ 10 mM y KH₂PO₄ 1.8 mM) estéril y se les agregaron 350 µL de cada dilución. Los viales conteniendo las diluciones del stock viral se agitaron en un vórtex a máxima velocidad tres veces antes de tomar los 350 µL y se hicieron cambios de punta entre cada pozo. Se permitió la infección durante una hora a 37°C, con agitación suave cada 15 minutos. Una vez concluido el tiempo de infección, se retiró el inóculo y se lavó cada pozo nuevamente con PBS 1X estéril. Una vez que se retiró el PBS, se agregaron 750 µL de carboximetilcelulosa al 1% (w/v) suplementada con MEM 2X (Gibco, Estado Unidos) en relación 1:1 (v/v) y se mantuvo en condiciones de cultivo estándar durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo, se retiró la carboximetilcelulosa con cuidado para no lastimar la monocapa de células y se fijó la monocapa con formalina al 3.7% en PBS 1X durante 15 minutos. Se retiró la solución de fijado y se tiñeron las células con cristal violeta al 0.5% (w/v) en metanol al 20% (v/v) durante 15 minutos. Una vez concluido el tiempo de teñido, las células se lavaron por inmersión en un recipiente con agua de grifo y se dejaron secar para observar las placas de lisis producidas por el virus (**Figura 10**).

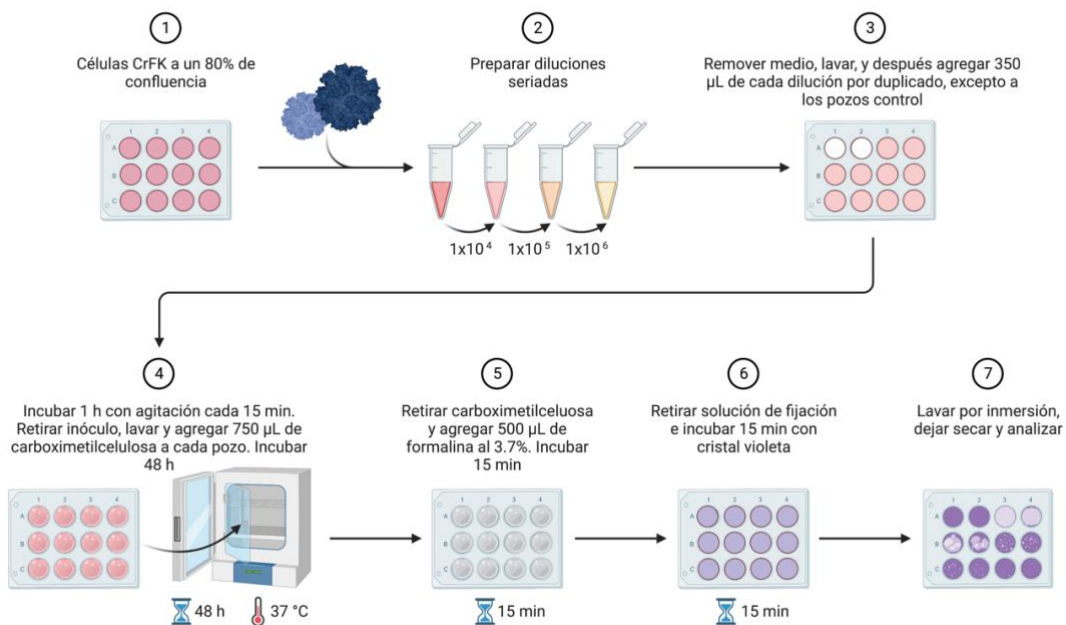


Figura 10 Ensayo de plaqueo.

Se muestran los pasos del ensayo de plaqueo. Células CrFK se sembraron en platos de cajas de cultivo de 12 pozos a una confluencia de alrededor del 80% y se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo celular. Se realizaron diluciones seriadas base 10 a partir de un stock viral cuyo título se desconocía. Antes de infectar a las células, se retiró el medio de mantenimiento y se lavó la monocapa con PBS 1X. Para cada dilución se utilizaron dos pozos a los que se les agregaron 350 μ L de la dilución correspondiente. Los primeros dos pozos se utilizaron como control negativo y los dos siguientes como control positivo, es decir que se les agregaron 350 μ L del stock viral sin diluir (virus total). Se permitió la adsorción viral durante una hora, realizando agitación suave cada quince minutos y una vez concluido el tiempo de infección, se retiró el inóculo viral y se lavó la monocapa nuevamente con PBS 1X, se agregaron 750 μ L de carboximetilcelulosa al 1% (w/v) en MEM suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v) y se mantuvo en incubación durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró la carboximetilcelulosa mediante aspiración y la monocapa se fijó con formalina al 3.7% durante quince minutos, al finalizar este tiempo, se retiró la formalina y se agregaron 500 μ L de cristal violeta y se dejó reposar durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de teñido, se lavaron los pozos por inmersión en un recipiente con agua de grifo, se dejó secar y se contabilizaron las placas de lisis en cada dilución. Reportado en (Escobar-Herrera, Medina-Ramirez et al. 2007). Partícula viral que se utilizó en la imagen: [PDB ID: 4PB6].

Inducción de la proteína VP1 en bacterias BL21(DE3) pLysS

Para la obtención de anticuerpos dirigidos contra VP1 de FCV que detectaran a la proteína desnaturalizada, se expresó a la proteína recombinante VP1-GST (Glutación S-transferasa) de la cepa Urbana del FCV que clonó la Ing. en Biotecnología Paredes Morales en su tesis de licenciatura en el plásmido pGEX-5X-1 y con el que transformó bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(DE3) pLysS (Paredes Morales 2016). De manera breve, a partir de bacterias congeladas *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformadas con el plásmido pGEX-5X-1-VP1 se obtuvo un preinóculo de 5 mL que se incubó en medio Luria-Bertani (LB [10 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl por cada litro de agua bidestilada]) estéril, suplementado con 0.1 mg/mL de ampicilina a 37°C, durante 12 - 16 horas en agitación (200 revoluciones por minuto [rpm]). Al día siguiente, se transfirió al preinóculo a un volumen de 100 mL de medio LB que se mantuvo a 37°C, a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (O.D) de 0.4 a una longitud de onda de 600 nanómetros (nm) (O.D 600), analizada en un espectrofotómetro de haz de luz horizontal (Bio-Rad SmartSpec™ Plus), momento en que se agregó el

inductor no hidrolizable isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG, Thermo Fisher Scientific) a una concentración final de 0.1 mM.

Terminado el tiempo de inducción que fue de 4 horas (Paredes Morales 2016), el cultivo se dividió en dos tubos cónicos de 50 mL y se centrifugó a 1000 rpm (134 x g) a temperatura ambiente durante 10 minutos (Centrífuga CL 2, Thermo Scientific). Antes de continuar con la purificación de la proteína, se analizó la fracción citosólica y la fracción enriquecida de cuerpos de inclusión, utilizando para esto último el protocolo descrito por Qiagen (Qiagen 2003). El análisis de proteínas se realizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Fig. 9). Se tomaron 15 µL de un cultivo de bacterias no inducidas, 15 µL de bacterias inducidas 10 y 15 µL de cada fracción, cada muestra se mezcló con el mismo volumen de buffer de muestra Laemmli 2X (4% SDS [v/v], 20% glicerol [v/v], 120 mM Tris-HCl 1M [pH6.8], azul de bromofenol 0.02% [w/v] y β-mercaptoetanol al 2% en agua bidestilada), en el que se hirvieron durante 5 min para después ser sometidas a SDS-PAGE (Laemmli 1970) a voltaje constante en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10%.

Una vez terminada la electroforésis el gel se tiñó con solución de azul de Coomassie (40% metanol [v/v], 10% ácido acético glacial [v/v], 0.02% Coomassie Brilliant Blue-R [w/v]) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se destiñó con solución de desteñido (40% metanol [v/v], 10% ácido acético glacial [v/v]).

Encontramos una mayor cantidad de la proteína inducida en los cuerpos de inclusión, que se puede observar en la **Figura 11** aproximadamente a la altura de 90 kDa que corresponden a los 60 kDa de la proteína VP1 más 26.9 kDa de GST. Para extraer a la proteína de cuerpos de inclusión se utilizó urea 8 M (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Urea 8M, [pH 8.0]) de acuerdo al protocolo de Qiagen (Qiagen 2003).

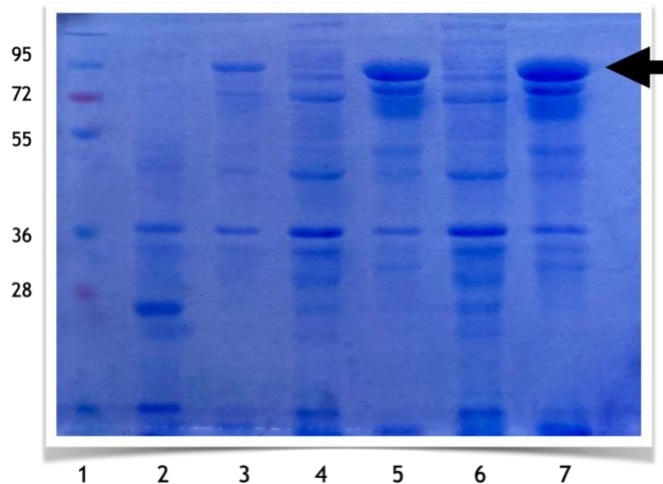


Figura 11 La inducción de la proteína recombinante VP1-GST ocurre en cuerpos de inclusión.

Electroforesis y tinción con azul de Coomassie de la proteína recombinante VP1-GST en la fracción citosólica y la fracción de cuerpos de inclusión de bacterias BL21 (DE3) pLysS transformadas con el plásmido pGEX-5X-1-VP1 en las que se indujo la expresión de la proteína recombinante con IPTG a una concentración final de 0.1 mM se separaron por SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie.. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: control negativo, extractos de bacterias no inducidas; carril 3: extractos de bacterias inducidas; carril 4: 10 µL de la fracción citosólica de bacterias inducidas; carril 5: 10 µL de la fracción de cuerpos de inclusión de bacterias inducidas; carril 6: 15 µL de fracción citosólica de bacterias inducidas; carril 7: 15 µL de la fracción de cuerpos de inclusión de bacterias inducidas.

Purificación de la proteína VP1-GST por electroelución

Una vez que se obtuvo la proteína de los cuerpos de inclusión, se purificó por electroelución. Para la purificación se utilizaron 350 µL la fracción de proteínas de cuerpos de inclusión que se mezclaron con el mismo volumen de buffer de muestra Laemmli 2X y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% de un solo pozo; se realizó SDS-PAGE a voltaje constante (80 volts). Para detectar a la banda correspondiente a la proteína VP1-GST se utilizó una tinción negativa reversible con sales de imidazol-zinc (Castellanos-Serra, Proenza *et al.* 1999). La purificación de la proteína se hizo por electroelución en una cámara electroforética horizontal Little Blue Tank™ a 100 volts durante 1 hora (Peñaflor-Téllez 2019).

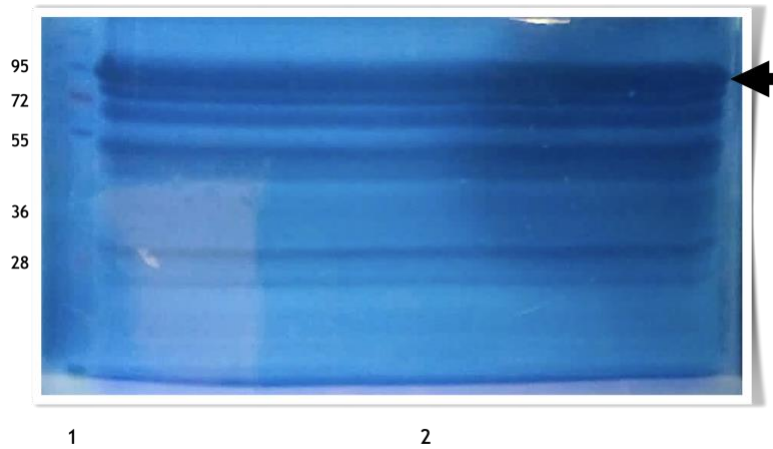


Figura 12 Sepacación de las proteínas de la fracción solubilizada de cuerpos de inclusión.

Una vez que se solubilizaron los cuerpos de inclusión, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida de un solo carril; para cada gel se utilizaron 350 μ L de la fracción de proteínas de cuerpos de inclusión. Se realizó una tinción negativa y reversible con imidazol para identificar la región correspondiente al peso esperado de la proteína recombinante VP1-GST (~90 kDa). Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: fracción de proteínas de cuerpos de inclusión.

Generación de anticuerpos anti-VP1 en ratón

Una vez que se purificó la proteína VP1 por electroelución y ya que se necesitaba en un estado desnaturalizado para generar un suero inmune que detectara a la proteína en ensayos de Western blot, se decidió inmunizar ratones BALB/c de 10 semanas de edad con 75 μ g de proteína en 200 μ L de PBS 1X y 10% de adyuvante TiterMax® Gold. En el día cero se tomó una muestra de suero antes de realizar la primer inmunización; en total se hicieron cuatro inmunizaciones con 15 días de diferencia; entre la tercer y cuarta inmunización, en el día 37 se tomó una muestra para realizar la titulación del suero (**Figura 13**). En el día 60 se realizó el sangrado a blanco y la obtención por centrifugación del suero inmune (**Figura 14**).

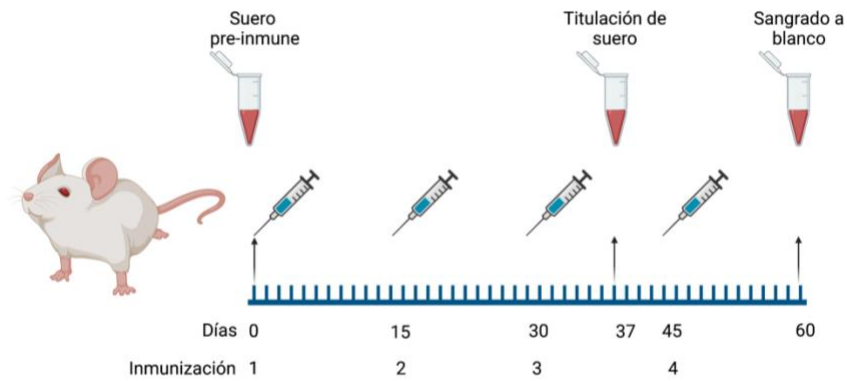


Figura 13 Esquema de inmunización de ratones para obtención de anticuerpos contra VP1. Ratones BALB/c de 10 semanas de edad fueron inoculados con 75 μ g de proteína VP1-GST en 200 μ L de PBS y 10% de adyuvante TiterMax® Gold. Las inmunizaciones se realizaron en el día cero, 15, 45 y 60. Antes de la primera inmunización se tomó una muestra de suero preinmune y al día 37 se realizó la titulación del suero por Western blot y al obtener una buena señal, se realizó el sangrado a blanco en el día 60.

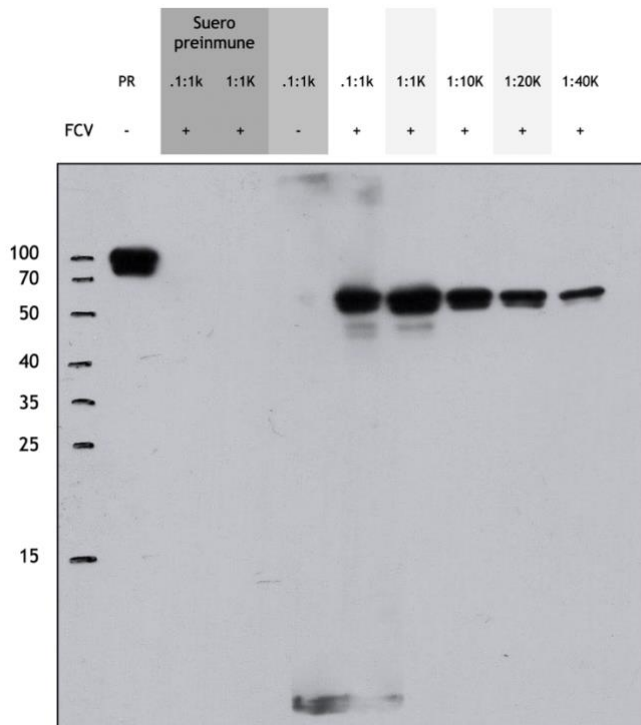


Figura 14 Titulación de suero inmune contra VP1.

Especificidad del suero inmune generado en ratón. PR: proteína recombinante. El suero preinmune se probó a dos diferentes concentraciones 0.1:1000 y 1:1000, a partir de las cuales se hicieron diluciones seriadas hasta llegar de 0.1:1000 a 1:40000. En el primer carril se observa el control de especificidad que es la proteína recombinante que se utilizó como inmunógeno para la generación de anticuerpos, con un peso de aproximadamente 90 kDa ya que se le suman 26.9 kDa, el peso de GST.

Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot

Para cada ensayo de Western blot realizado en este trabajo se utilizaron 10 μ g de proteínas de cada muestra, cuantificados por el método del ácido bicinonínico (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). Se tomó el volumen

correspondiente a 10 µg de proteína de alícuotas de los extractos totales mantenidas a -20°C, éstos se mezclaron con buffer de muestra Laemmli 5X y se llevaron a un volumen final de 12.5, o 18.75 µL con agua bidestilada, estos se incubaron a 80°C +/- 2°C durante 5 minutos para evitar la ruptura de enlaces entre Asp-Pro que ocurre entre 95 - 100°C (Kurien y Scofield 2012). Después de 5 minutos, las muestras se sometieron a un pulso de centrifugación para separar cualquier detrito presente y se cargaron en geles de poliacrilamida desnaturizantes de 1.5 mm de grosor. La electroforesis se llevó a cabo en el sistema de cámara húmeda de Bio-Rad con fuentes de poder PowerPac HC, también de BioRad, utilizando el buffer de corrida Tris-glicina (BioRad), a un voltaje constante (75 volts) durante 2 horas, dependiendo del porcentaje de acrilamida y de la proteína que de interés.

Una vez terminada la electroforesis, se procedió con la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm o de 0.45 µm (Bio-Rad #1620112 o #1620115, respectivamente) (Renart, Reiser *et al.* 1979, Towbin, Staehelin *et al.* 1979, Burnette 1981). Antes de iniciar la electrotransferencia de proteínas, la membrana y el gel se equilibraron durante 30 minutos en buffer de transferencia enfriado previamente a -20°C durante 20 minutos, en hielo (Gooderham 1984). El buffer de transferencia utilizado en todos los experimentos fue el buffer de Dunn o buffer de carbonatos (Dunn 1986).

Los anticuerpos utilizados en experimentos de Western blot fueron los siguientes: αHsp90B (Abcam ab2927, policlonal conejo) 1:12,000, αSTING 1:2,500 (Invitrogen PA523381, policlonal conejo), ambos diluidos en TBS-Tritón X100 al 1% con leche semidescremada al 1% (Svelty, Nestlé®), αHsp70 1:500 (Santa Cruz Biotechnology sc-66048, monoclonal ratón), αβ-Actina 1:60,000 (Santa Cruz Biotechnology sc-47778, monoclonal ratón), αLC3B I/II 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology sc-271625, monoclonal ratón), todos ellos diluidos en PBS-Tween 20 al 1%. El suero inmune dirigidos contra la proteína viral NS6/7 fue donado amablemente por el Dr. Ian Goodfellow, de la Universidad de Cambridge, Reino Unido. Este suero de conejo αNS6/7 se utilizó 1:12,000 diluido en PBS-Tritón X100 al 1% (v/v) con 1% (w/v) de leche semidescremada (Svelty, Nestlé®), suero de

ratón α LC obtenido por nuestro grupo de trabajo (Peñaflor-Téllez 2019), se utilizó 1:60,000 diluido en PBS-Tween 20 al 1% (v/v) con leche semidescremada al 1% (w/v) (Svelty, Nestlé®). El suero de ratón α VP1 1:90,000 diluido en PBS-Tween 20 al 1% (v/v).

Se utilizaron placas autorradiográficas (Carestream, E.U.A.) para observar las bandas correspondientes a las proteínas detectadas. Las soluciones utilizadas para revelar y fijar las placas se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Carestream, E.U.A.). La digitalización de las imágenes se realizó utilizando un escáner EPSON Perfection V19 y se analizaron utilizando el software de libre acceso Fiji (<https://fiji.sc>). Para la cuantificación relativa se siguió el protocolo descrito en: Quantifications of western blots with Image J (Davarinejad 2015) y se siguieron las notas técnicas de Invitrogen sobre normalización (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Technical-Notes/ibright-normalization-western-blotting-relative-quantitation-technical-note.pdf>)

Fármacos y tratamientos

Se utilizó geldanamicina (Santa Cruz Biotechnology sc-200617) a una concentración de trabajo de 100 μ M, final de 0.5 μ M; el fármaco se mantuvo en alícuotas de 10 μ L a -20°C a una concentración de 1 mM para evitar rondas de congelado/descongelado. En cada experimento se descongeló una alícuota nueva y se llevó a la concentración de trabajo. El fármaco CQ se utilizó a una concentración de trabajo de 50 mM, final de 100 μ M. El fármaco MG132 se utilizó a partir de una concentración de trabajo de 56.22 y 52.56 mM, final de 25 μ M. CQ fue donada amablemente por el Dr. Bulmaro Cisneros del departamento de Genética y Biología Molecular, mientras que MG132 nos fue regalada amablemente por el Dr. José de Jesús Serrano del departamento de Biología Celular, ambos del Cinvestav, Zacatenco.

Ensayo de viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular se realizaron ensayos de MTT (**Figura 15**); en estos se utiliza el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difeníl tetrazolio o

MTT, una sal de monotetrazolio que es reducido por las oxidorreductasas y deshidrogenasas de células metabólicamente activas a formazán, una sal insoluble en agua, de manera que el último paso del ensayo requiere de la solubilización de los cristales formados (Ghasemi, Turnbull *et al.* 2021).

La solución stock de MTT (Sigma, Alemania) se preparó a una concentración 12 mM en PBS 1X y se filtró con una membrana de ésteres de celulosa mixtos (MICE) de 0.22 μm , después de su preparación se mantuvo protegida de la luz a 4°C y se consideró funcional durante las siguientes 4 semanas a su preparación (Millex®-GS, Merk Millipore, Irlanda) (Kumar, Nagarajan *et al.* 2018).

Se realizaron ensayos de viabilidad para analizar la toxicidad de todos los fármacos utilizados en este trabajo. El rango de concentraciones analizadas para Geldanamycin (GA) fue de 0.2, 0.3, 0.5, 0.8 y 0.9 μM . Para Cloroquina (CQ) de 25, 50, 75 y 100 μM . Para MG132 de 10, 15, 20, 25, 40 y 50 μM .

Para analizar el efecto de cada fármaco todos ellos, células CrFK se sembraron en cajas Corning® de 96 pozos de fondo plano, a una confluencia del 80-90%. Para analizar el efecto de GA en la viabilidad celular se incubó la droga durante un total de 13 horas previas al inicio del ensayo de viabilidad. Para analizar el efecto de la CQ se dio un tratamiento de 6 horas en total, incluyendo las 4 horas de incubación de MTT. Para analizar el efecto de MG132 se dio un tratamiento de 8 horas en total, incluyendo las 4 horas de incubación del MTT. Para los tratamientos de dos drogas, se incubó la combinación GA/CQ durante 6 horas en total, incluyendo las 4 horas de la incubación de MTT. Para la combinación de GA/MG132 se incubó un total de 8 h para MG132 y 6 horas en total para GA, incluyendo las 4 horas de incubación de MTT. La presencia de rojo fenol en el medio de mantenimiento puede interferir con la lectura de absorbancia, por lo que se recomienda la solubilización de la membrana celular y los cristales de formazán con una solución de SDS al 10% en ácido clorhídrico 0.01 N, para lograr la solubilización, las células se mantienen con la solución de SDS durante 4 - 18 horas a 37°C, dependiendo de la cantidad de formazán formado de acuerdo a este protocolo se deja reposar a las células con la solución a 37°C en una cámara humidificada durante 10 - 18 horas después de lo cual se lee la absorbancia a una

longitud de onda de 570 nm y se resta el fondo a una longitud de onda de 690 nm (Tada, Shiho *et al.* 1986, Kumar, Nagarajan *et al.* 2018).

La absorbancia de todos los experimentos se leyó utilizando el lector de placas SUNRISE TECAN, con el software Magellan 2, que amablemente nos proporcionó el Dr. Leopoldo Santos del departamento de Biomedicina Molecular del Cinvestav, Zacatenco, durante la duración de todo este proyecto.

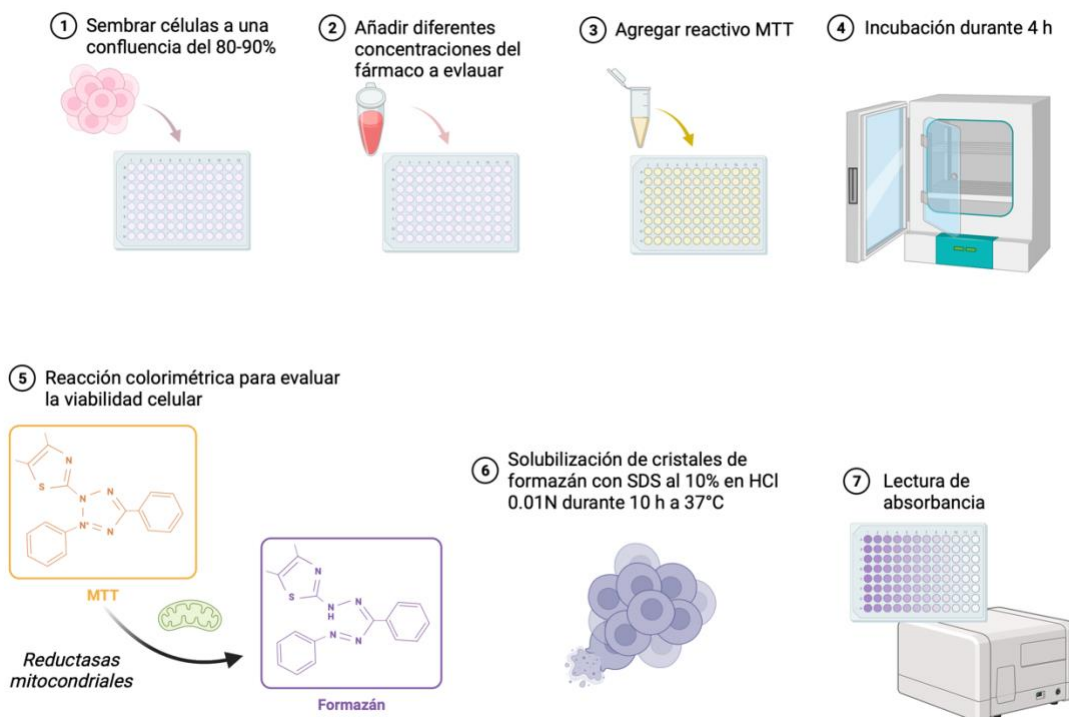


Figura 15 Ensayo de viabilidad celular por MTT.

Células a una confluencia de 80% fueron tratadas con las diferentes concentraciones de los fármacos a evaluar. Se incubó GA durante 13 horas antes de agregar MTT, CQ 2 horas antes de agregar MTT y MG132 4 horas antes de agregar MTT. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregó MTT y se incubó 4 horas a condiciones estándar de cultivo celular. Una vez terminado este tiempo, se agregaron 100 μ l de SDS al 10% en HCl 0.01 N y se dejó incubar a 37°C sin agitación durante 10 horas. Pasado el tiempo de incubación, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 690 nm y se restó el fondo con una segunda lectura a 570 nm (Tada, Shiho *et al.* 1986, Kumar, Nagarajan *et al.* 2018).

Ensayo de ligación por proximidad

El ensayo de ligación por proximidad se realizó con el sistema de Duo-Link® de acuerdo con las instrucciones del fabricante y como se ha llevado a cabo previamente en nuestro grupo de trabajo (Trujillo-Uscanga y Gutiérrez-Escolano

2020). Se buscó interacción entre la proteína viral VP1 y la proteína Hsp90B, para esto, células fueron sembradas sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro y una vez crecidas al 80% de confluencia, se le prepararon para un ensayo de inmunofluorescencia. De manera breve, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X filtrado, se fijaron con formaldehído al 4% en PBS 1X (v/v) durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron 3 veces por 5 minutos y se permeabilizaron con Tritón-X100 al 0.01% (v/v) durante 5 minutos; se bloquearon con la solución de bloqueo proporcionada por el kit de Duolink® (DUO82007-4ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregó el anticuerpo primario a la concentración usual (1:500 VP1 y 1:100 Hsp90B) diluido en la solución de anticuerpos provista por el kit de Duolink (DUO82008-2.5 ml) y se dejó incubando toda la noche. Para la segunda parte del protocolo se siguieron las instrucciones del fabricante del kit de Duolink® (DUO92101) (**Figura 16**), en los que se agregan los anticuerpos dirigidos contra la región conservada (Fc) de los anticuerpos primarios utilizados y que se encuentran unidos a una sonda que podrá ser ligada solamente si ambos anticuerpos primarios se encuentran a < 40 nm de distancia (Fredriksson, Gullberg *et al.* 2002, Hegazy, Cohen-Barak *et al.* 2020, Alam 2022). Para esto se necesita un paso de ligación, amplificación y finalmente se detección. Para el último paso se utilizó un microscopio confocal Zeiss LSM-700 utilizando la proyección máxima.

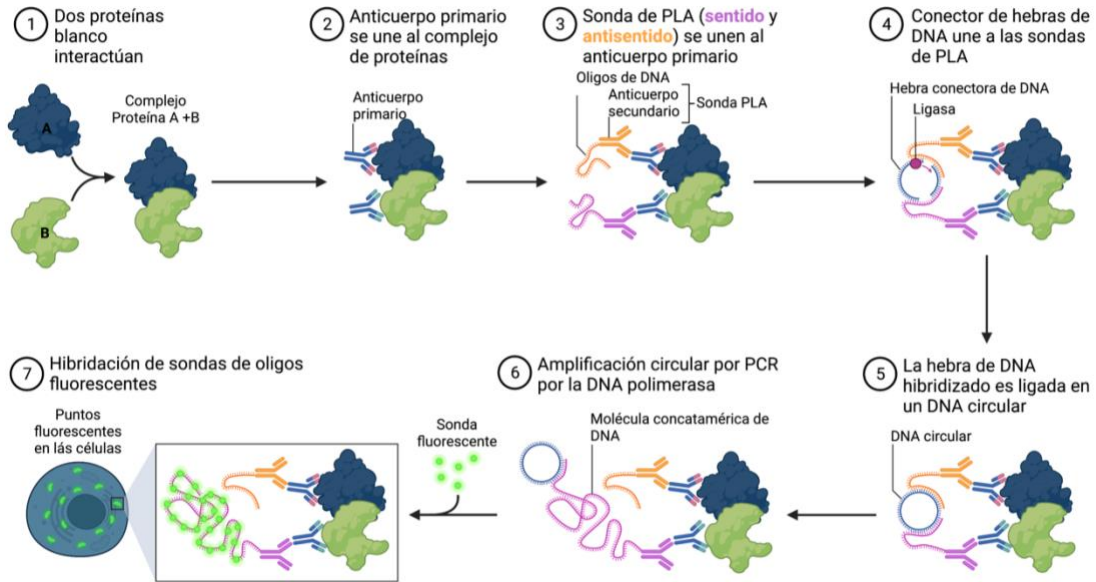


Figura 16 Ensayo de ligación por proximidad (PLA) DuoLink®.

En la imagen se describe la segunda parte del protocolo. Para detectar la interacción entre las proteínas de interés se incubó la muestra con los anticuerpos primarios que las reconocen, es necesario que éstos sean de especies diferentes para poder llevar a cabo el ensayo. El anticuerpo primario es reconocido por el anticuerpo secundario del kit (sondas PLA) que se incuban durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación se lava con el buffer A (DUO8249-4L) y se procede a realizar la ligación, la reacción se incubó a 37°C durante 30 min. Una vez realizada la ligación, se lava con el buffer B (DUO82049-4L) se realiza la amplificación durante 100 min a 37°C. El último paso es un lavado con el buffer B, las muestras se montan con una solución que también proporciona el kit que incluye DAPI (DUO82040-5ml). Las muestras se observan en un microscopio de epifluorescencia o un microscopio confocal utilizando la proyección máxima.

Resultados

El sistema de proteínas chaperonas de Hsp90 es el más estudiado en el contexto de infecciones virales, su requerimiento para que miembros de la familia *Caliciviridae* lleven a cabo una replicación eficiente ha sido reportada previamente (Vashist, Urena *et al.* 2015) y nuestro grupo de trabajo cuenta con datos no publicados que sugieren lo mismo para FCV (Palafox 2015).

Antecedentes de nuestro grupo de trabajo demostraron que la cepa F9 del FCV no modula la expresión de Hsp90 durante el ciclo de infección (Palafox 2015). La cepa F9 es una cepa vacunal (Smith, Afonso *et al.* 2020), mientras que la cepa Urbana (URB) que se utilizó en este trabajo, es una cepa infecciosa que fue aislada a finales de la década de los 60's a partir de un gato con una enfermedad respiratoria aguda (Sosnovtsev y Green 1995). Por lo anterior se consideró la posibilidad de encontrar un comportamiento diferente entre cepas y se decidió evaluar si la infección por FCV URB modula la expresión de Hsp90 durante su ciclo de replicación.

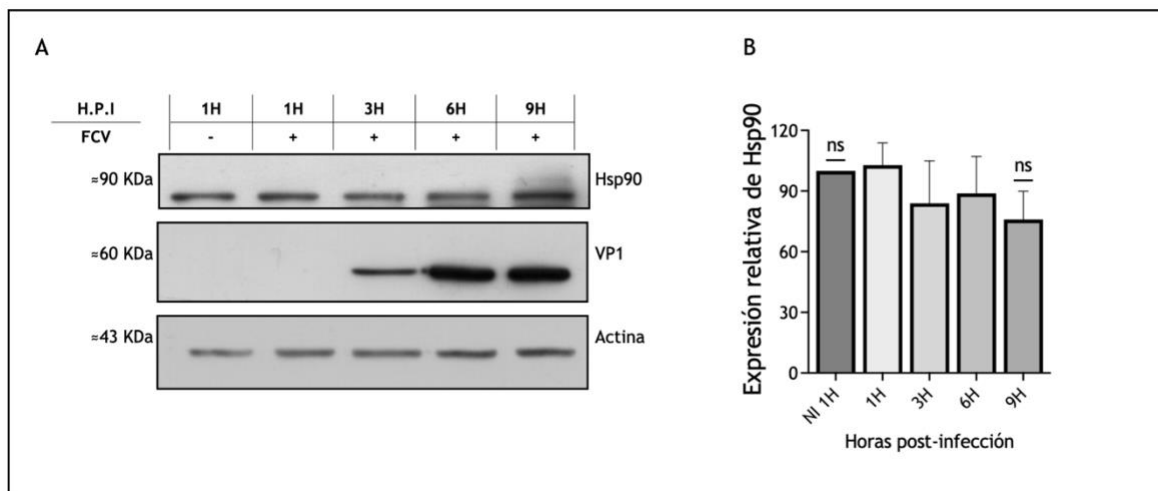


Figura 17 La infección por FCV no modula la expresión de Hsp90.

Células CrFK a una confluencia del 80% se infectaron con la cepa URB de FCV a una M.O.I de 5. Se realizaron extractos proteicos totales con RIPA a la 1, 3, 6 y 9 horas post-infección (H.P.I.). A. Mediante western blot se evaluaron los niveles de Hsp90 y se utilizó VP1 como control de infección. B. El análisis estadístico se realizó con el software de GraphPad prism 9 y se utilizó T de Student para comparar cada hora con el control de células no infectadas. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. Se muestra una imagen representativa de por lo menos 3 experimentos.

En concordancia con los resultados de la tesis de Ortíz Palafox en el 2015, no se observó una modificación estadísticamente significativa de los niveles de Hsp90 a lo largo del ciclo de infección (**Figura 17**). Por lo que nos dispusimos a inhibir la actividad de Hsp90 y evaluar su efecto sobre la replicación viral.

Para determinar si la función de Hsp90 es necesaria durante la replicación del FCV, se realizaron ensayos de infección en presencia del inhibidor geldanamicina (GA). Inicialmente se evaluó la viabilidad celular por ensayos de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difetil tetrazolio] en presencia de GA a las concentraciones de 0.2, 0.3, 0.5, 0.8 y 0.9 mM de GA durante 13 horas, considerando que el ciclo de replicación de FCV es de 9 horas a una M.O.I. de 5

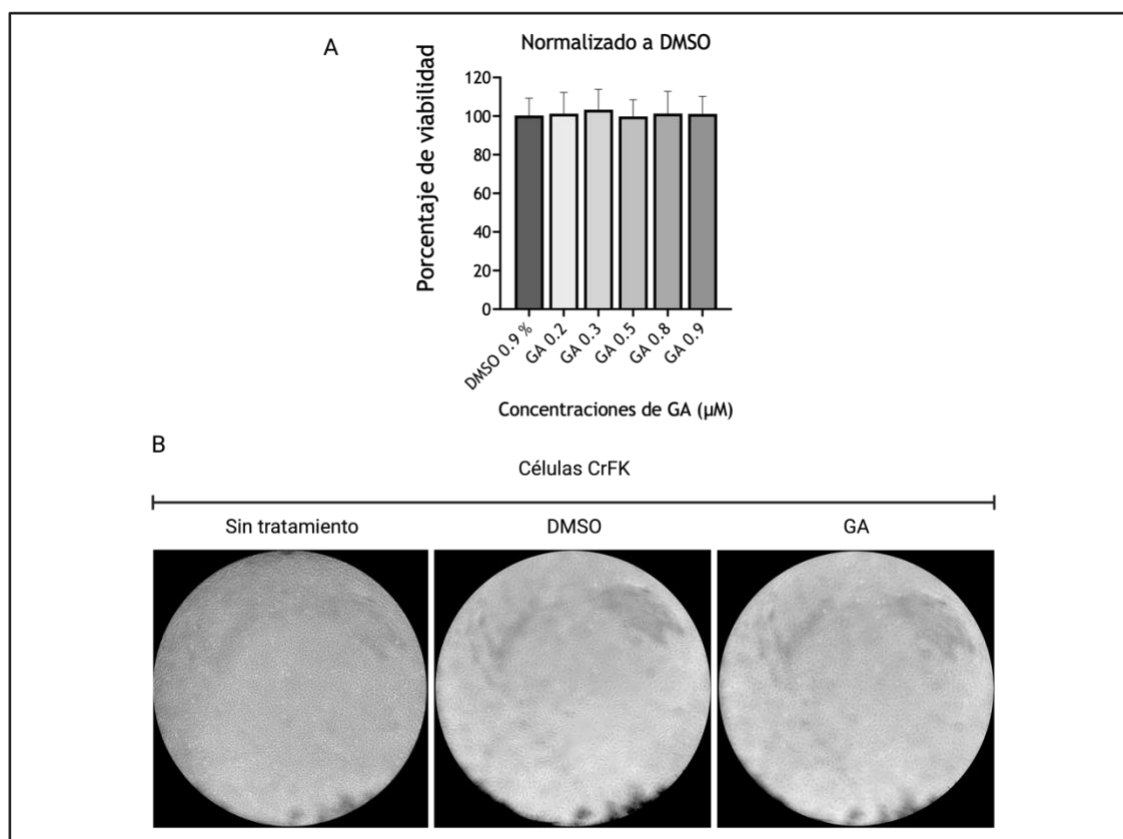


Figura 18 La inhibición de la actividad de Hsp90 no tiene un efecto significativo en la viabilidad de las células CrFK.

A. Células CRFK a una confluencia de 80% se trataron durante 13 horas con concentraciones de GA de 0.2, 0.3, 0.5, 0.8 y 0.9 μM y la viabilidad celular se determinó mediante ensayos de MTT. B. La apariencia macroscópica de la monocapa de células CRFK se analizó a las 9 horas para determinar el posible efecto citopático o disrupción de la monocapa en células tratadas con GA y con DMSO, el vehículo de la droga.

El ensayo de MTT no mostró una variación estadísticamente significativa en la viabilidad celular a ninguna de las concentraciones de GA probadas, por lo que decidimos utilizar la concentración de 0.5 μM de GA (**Error! Reference source not found.**).

Hsp90 es una pieza clave de la maquinaria de regulación proteostática de la célula, está conservada evolutivamente y es una de las proteínas más abundantes aún en células en condiciones normales. La inhibición de su actividad por un fármaco como GA que tiene un efecto sobre los cuatro parálogos de la proteína se espera que afecte no solamente a las proteínas virales, sino también a las proteínas celulares, cuya actividad biológica está ligada a la actividad de esta chaperona. Por lo tanto, decidimos agregar la droga en el tiempo cero, es decir una vez que se concluyó la hora de adsorción viral y evaluar el efecto de su administración a diferentes tiempos sobre la producción de proteínas virales, limitando el efecto pleiotrópico de la inhibición de Hsp90 sobre blancos celulares.

Inicialmente, para determinar si la inhibición de la actividad de Hsp90 afectaba la replicación viral, por lo que evaluamos la producción de partículas virales en el sobrenadante de células infectadas y tratadas con GA, mediante ensayos de plaqueo (**Figura 19**). La infección de las células tratadas con GA trajo como consecuencia una reducción estadísticamente significativa de la producción de partículas virales de aproximadamente 1.5 órdenes de magnitud en escala

logarítmica, indicando que la actividad de Hsp90 es importante para la replicación del FCV (Figura 19).

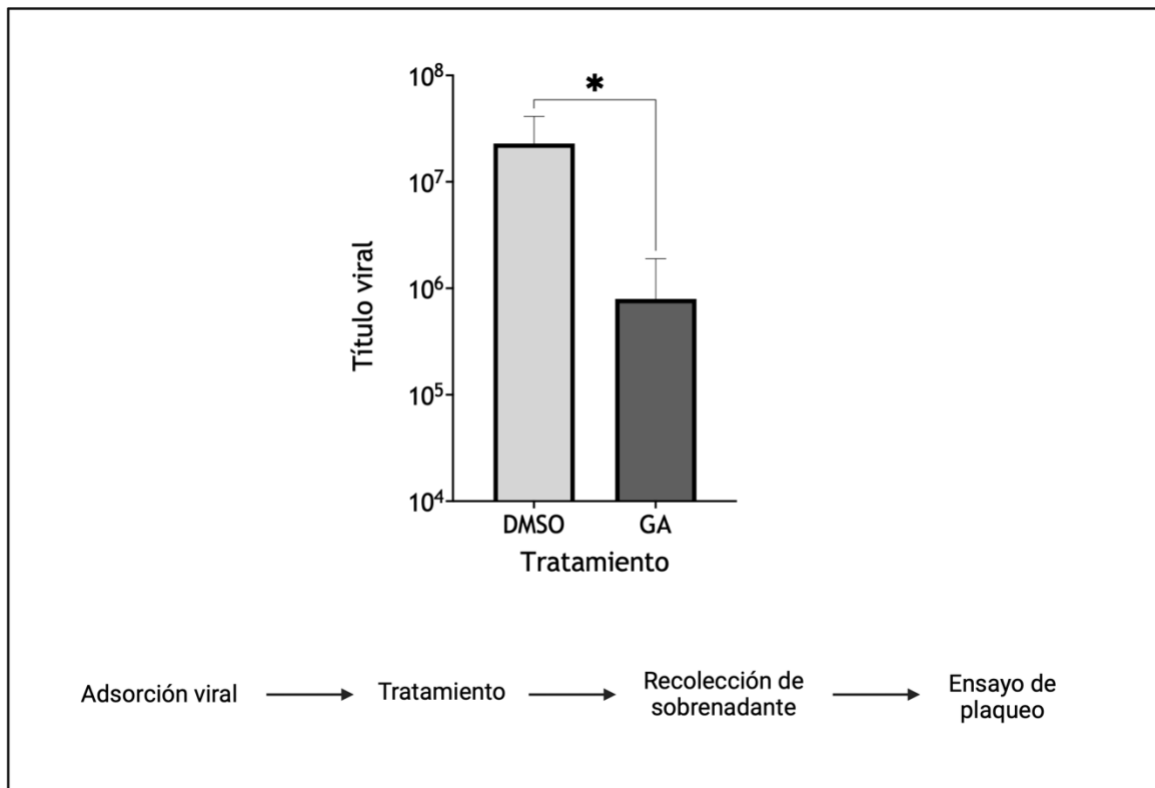


Figura 19 La producción de partículas virales de células disminuye significativamente cuando se inhibe la actividad de Hsp90.

Células CRFK infectadas con la cepa URB de FCV a una M.O.I. de 5 se trataron con GA o con el vehículo (DMSO). A las 6 horas de infección, se recolectó el sobrenadante y la presencia de partículas virales se cuantificó por ensayos de plaqueo. Para el análisis estadístico se utilizó GraphPad Prism 9; T de Student para comparar ambas condiciones y se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$ (*).

La proteína Hsp90 es necesaria para la estabilidad de la proteína estructural VP1

Una vez corroborado que la actividad de la proteína Hsp90 es importante para una replicación eficiente del FCV, decidimos determinar en qué etapa de la replicación viral participa. Se ha documentado ampliamente la dependencia de proteínas virales por la actividad de chaperona de Hsp90, así como la interacción entre esta chaperona y genomas virales de RNA, dentro de los que se incluye al de MNV (Vashist, Urena *et al.* 2012), por lo que podría estar involucrada en la

regulación de su traducción y/o replicación. La primera aproximación que realizamos fue evaluar por Western blot los niveles de proteínas virales durante el ciclo de replicación en células CrFK infectadas a una M.O.I. de 5 en presencia de GA o de su vehículo, DMSO (**Figura 20**).

Decidimos evaluar a la proteína no estructural NS6/7, o proteínasa/polimerasa viral, ya que se traduce a partir del genoma viral y, por lo tanto, es considerada una proteína temprana. Las variaciones observadas en los niveles de NS6/7 en los tiempos de 3, 6 y 9 HPI, en ausencia y presencia de GA, no son estadísticamente significativas, sugiriendo que ni la traducción del genoma viral ni la estabilidad de NS6/7 dependen de la actividad de esta chaperona (**Figura 20**). De la misma manera evaluamos los niveles de la proteína VP1, que se genera a partir del RNA subgenómico (**Figura 20**), y encontramos que a diferencia de lo observado con NS6/7, sus niveles sí disminuyen de manera estadísticamente significativa desde las 3 y hasta las 9 horas postinfección (H.P.I.) entre un 50 - 70% (**Figura 20**).

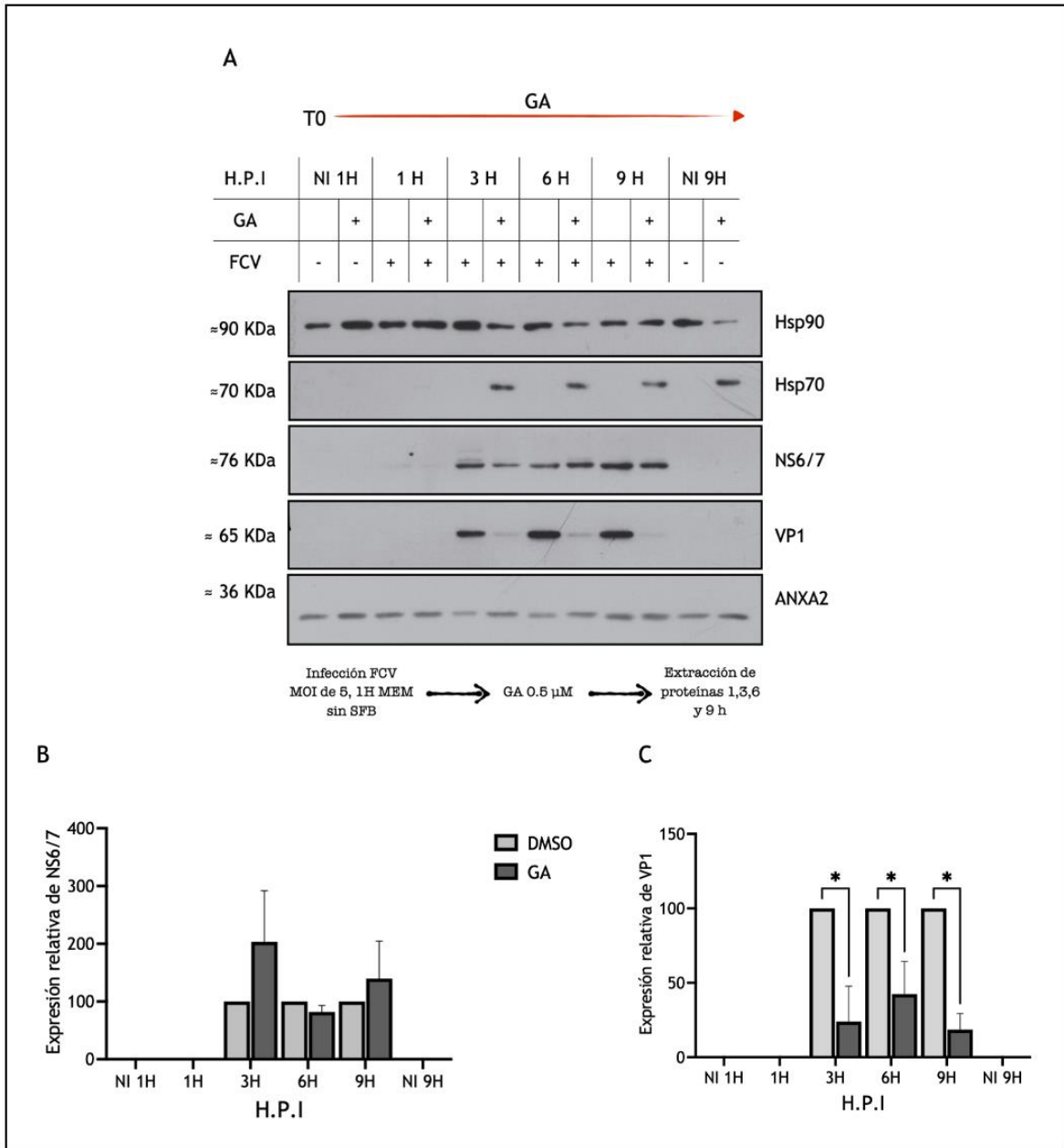


Figura 20 La actividad de Hsp90 afecta la estabilidad de proteína estructural VP1 pero no de la no estructural NS6/7.

Células CrFK se infectaron con la cepa URB de FCV a una MOI de 5 y pasada la hora de adsorción viral, se administró GA a una concentración de 0.5 μM. DMSO se utilizó como control del vehículo de la droga. Se obtuvieron extractos proteicos totales con RIPA a la 1, 3, 6 y 9 horas post-infección (H.P.I.). A. Mediante western blot se evaluaron los niveles de Hsp90, Hsp70, NS6/7 y VP1. ANXA2 se utilizó como control de carga. B. El análisis estadístico se realizó con el programa Graphpad prism 9 y se utilizó la prueba Anova de dos

vías. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$ (*) y muy significativo un valor de $p < 0.001$ (***)).

Con la finalidad de analizar a mayor detalle el papel de Hsp90 durante el ciclo de replicación de FCV, decidimos agregar el inhibidor de Hsp90 a diferentes tiempos post-infección y recolectar las proteínas totales a las 7 H.P.I., para con ello inferir la etapa post entrada en la que podría estar participando. Pudimos observar una reducción de VP1 estadísticamente significativa al agregar la droga en todos los tiempos post-infección evaluados, en comparación con los niveles de VP1 en presencia del vehículo DMSO. El hecho de que se observe un efecto negativo sobre los niveles de VP1 agregando GA a 1 o 3 horas, confirma que el efecto observado es sobre un paso temprano/intermedio del ciclo de replicación, es decir, durante las primeras rondas de traducción/replicación del genoma viral (**Figura 21**).

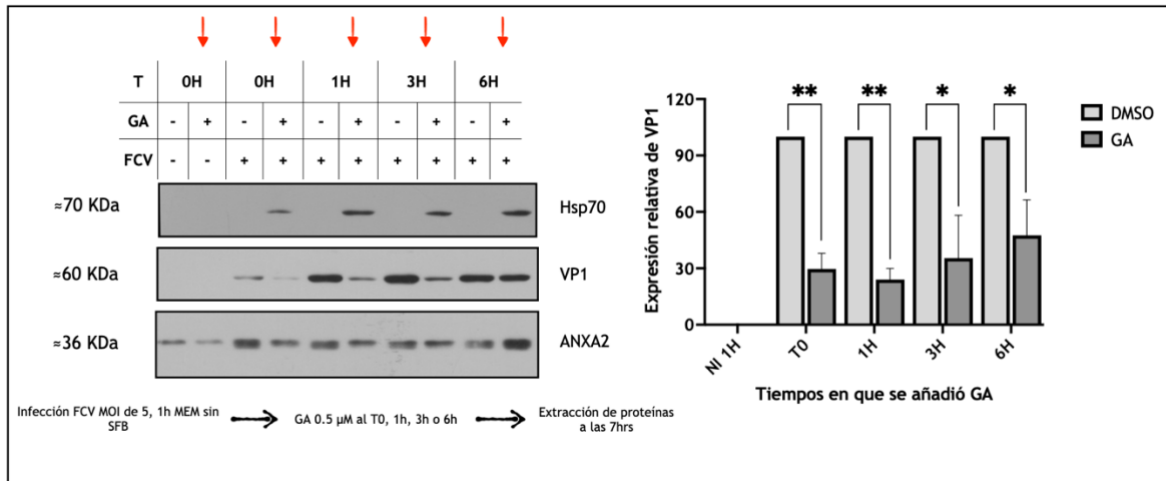


Figura 21 Geldanamicina regula negativamente la expresión de VP1 cuando es añadida desde tiempos tempranos de la infección.

Células CRFK a una confluencia del 80% se infectaron con FCV cepa Urbana a una M.O.I de 5 durante 1 hora en condiciones estándar de cultivo celular, pasada la hora de adsorción, se agregó GA a una concentración $0.5 \mu\text{M}$ al tiempo cero (T0), a 1 hora, a 3 horas y a 6 H.P.I. Las células se recolectaron a las 7 H.P.I. Se realizaron extractos proteicos totales con RIPA. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de VP1, HSP70 (control de actividad de GA), y ANXA2 (control de carga). B) El análisis de la densitometría de las bandas de tres experimentos distintos se realizó con el software GraphPad Prism 9 y el análisis estadístico se realizó con la prueba T de Student, en la que se comparó cada tiempo con su equivalente de células tratadas con DMSO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Estos resultados demuestran que la inhibición de la actividad de Hsp90 durante el ciclo de replicación del FCV, tiene un efecto negativo y específico en los niveles de la proteína VP1. Esta reducción de VP1 podría ser por: 1) el requerimiento de la actividad de Hsp90 para su plegado correcto y estabilidad o 2) debido a un efecto sobre la expresión de VP1; éste último podría deberse a que el virus requiera la actividad de Hsp90 para sintetizar o traducir su RNA subgenómico, que es a partir del cual se expresa VP1, o bien, para su traducción.

La inhibición de Hsp90 favorece un aumento en la traducción del precursor LC-VP1

Tanto la reducción en la producción de partículas virales como la de la cantidad de VP1 durante el ciclo de infección cuando Hsp90 está inactiva, sugieren fuertemente que VP1 es cliente de Hsp90. Sin embargo, se ha reportado que Hsp90 puede favorecer un estado permanente de traducción en algunos mensajeros de RNA (mRNA) celulares (Tsvetkov, Eisen *et al.* 2020) y en el caso del virus del Mosaico del Bambú, la interacción directa de Hsp90 con la región 3' no traducida (3' UTR) mejora de manera específica la replicación viral (Huang, Hu *et al.* 2012). Por este motivo, decidimos explorar si Hsp90 pudiera estar involucrada en la producción o traducción del RNA subgenómico viral, ya que su falta de actividad afecta específicamente a VP1, una proteína tardía producida a partir de éste, y no a NS6/7 que se traduce en etapas tempranas del ciclo de replicación a partir del RNA genómico.

Una ventaja de utilizar el modelo de FCV es que la proteína VP1 se traduce inicialmente como un precursor LC-VP1 de 74 kDa, codificado en el ORF2. Éste contiene en su extremo amino terminal a la proteína LC, que posteriormente es escindida mediante la acción de la proteínasa NS6/7 para liberar a la proteína LC y a la proteína VP1 madura. El detectar al precursor LC-VP1, nos permite evaluar de manera directa la producción y traducción del sgRNA. Para detectar al precursor LC-VP1, se podían utilizar cualquiera de los sueros inmunes producidos por nuestro grupo de trabajo que reconocen a la proteína VP1 o a LC. Inicialmente utilizamos

el suero anti-LC, ya que con él se detecta al precursor, que tiene una masa molecular de 74 kDa y a LC de 14 kDa; mientras que al usar el suero anti-VP1, detectaríamos al precursor y a la proteína VP1 madura, que por su cercanía en la migración y por la gran cantidad de VP1 que se produce, podría enmascarar la detección del precursor.

Para determinar los niveles del precursor LC-VP1, las células CRFK fueron tratadas con DMSO o GA e infectadas por 9 H, y los niveles del precursor LC-VP1, así como de las proteínas LC y VP1 maduras se evaluaron por Western Blot a las 3, 6 y 9 horas postinfección (**Figura 22**). Los niveles del precursor LC-VP1 se detectaron a partir de las 3 y hasta las 9 H.P.I en ambas condiciones. Tanto en células tratadas sólo con el vehículo de la droga, como en las tratadas con GA, los niveles del precursor aumentan conforme transcurre la infección (**Figura 22**), sugiriendo que la proteína Hsp90 no regula negativamente la integridad o traducción del sgRNA. Sin embargo, cuando la actividad de Hsp90 se encuentra inhibida, se observa una tendencia al aumento de los niveles del precursor LC-VP1 a las 3 y 6 H.P.I., misma que es estadísticamente significativa a las 9 H.P.I..

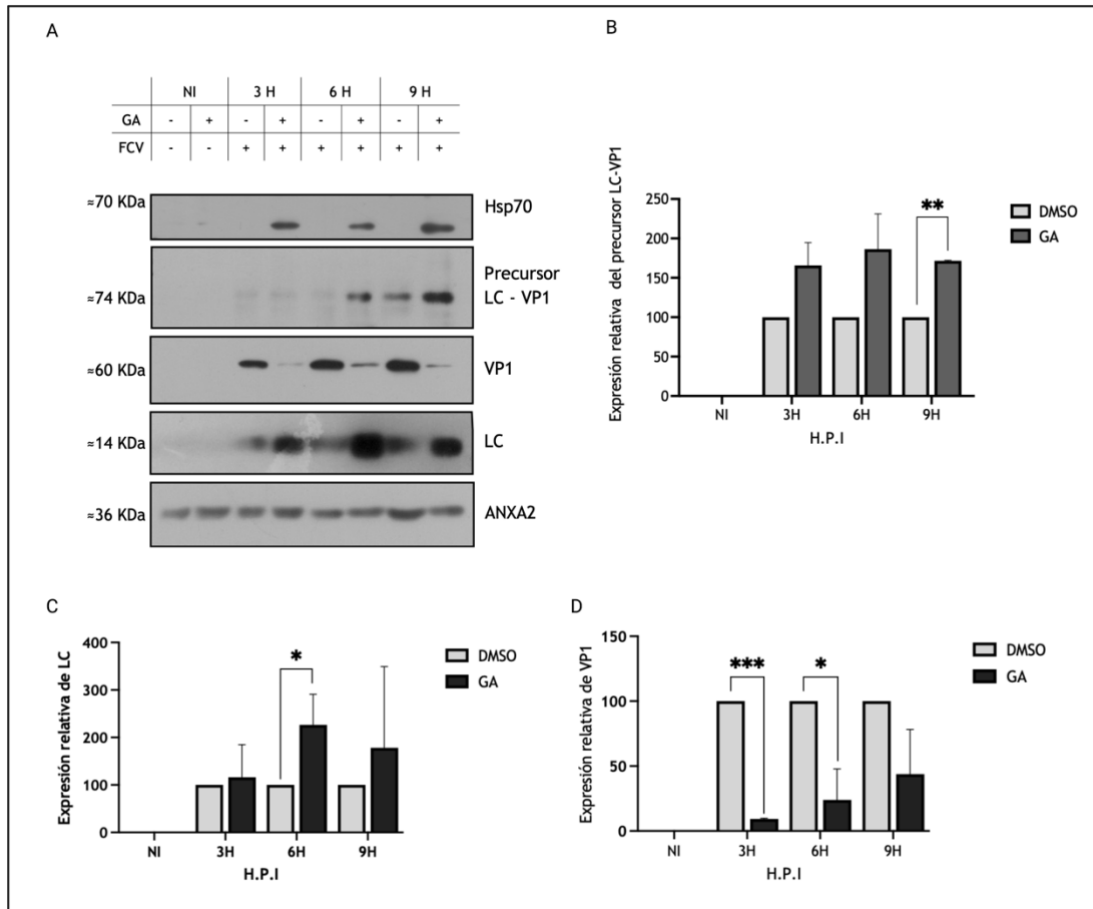


Figura 22 El precursor LC - VP1 aumenta cuando la actividad de Hsp90 está inactiva.

Células CrFK se infectaron con la cepa URB de FCV y se trataron con el GA o con el vehículo de la droga. Se permitió la infección durante 6 horas y se obtuvieron extractos proteicos totales con RIPA. A. Mediante western blot se analizaron los niveles del precursor LC-VP1 así como los de LC y VP1. ANXA2 se utilizó como control de carga. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos. Para el análisis estadístico de la expresión del precursor (B), LC (C) y VP1 (D) se utilizó el software Graphpad Prism 9, se utilizó T de Student para comparar los extractos tratados con GA contra su control de DMSO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En relación con los niveles de LC, observamos que esta proteína se comienza a detectar a las 3 y hasta las 9 H.P.I., observándose un incremento que es dependiente del tiempo de infección. Este efecto es semejante en presencia de GA; sin embargo, los niveles de LC comparados con los obtenidos en presencia de DMSO son significativamente mayores (**Figura 22**). El comportamiento de VP1 es congruente con lo reportado en experimentos previos de este trabajo.

Estos resultados en su conjunto, indican que la actividad de Hsp90 no es indispensable para la producción de VP1 por lo que los niveles bajos detectados en presencia de GA, cuando la actividad de Hsp90 se encuentra inhibida, debe estar involucrada en la estabilidad, sugiriendo fuertemente que VP1 es cliente de Hsp90, no así la proteína LC y ni el precursor LC-VP1. La discrepancia entre la disminución de los niveles de VP1 y el aumento de los niveles del precursor LC-VP1 y de la proteína LC, sugieren que la inhibición de Hsp90 favorece directa o indirectamente la cantidad que se sintetiza de sgRNA o su traducción.

La proteína VP1 de FCV es cliente de Hsp90

Debido a que Hsp90, es una chaperona que interactúa de manera directa con sus proteínas cliente (Radli y Rüdiger 2018), decidimos evaluar si existe tal interacción entre Hsp90 y VP1. Para ello, se realizaron ensayos de ligación por proximidad (PLA), que permite detectar interacciones transitorias proteína-proteína, con una cercanía < 40 nm.

Para realizar los ensayos de PLA, se sembraron células en cubreobjetos, se infectaron con FCV a una M.O.I. de 5 y se trataron con anticuerpos α -VP1 y α -Hsp90; la interacción entre ambas proteínas se evaluó mediante inmunofluorescencia utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM700 (**Figura 23**).

La señal positiva en el ensayo del PLA, indica que Hsp90 y VP1 se encuentran en estrecha proximidad (< 40 nm de distancia) a las 6 H.P.I. (**Figura 23**, panel inferior). Esta señal es específica ya que cuando se omite el anticuerpo anti VP1, no se observa la marca fluorescente (**Figura 23**, panel superior).

Estos resultados indican que ambas proteínas interaccionan y en conjunto con los ensayos de degradación de VP1 cuando Hsp90 está inactiva demuestran que VP1 es una proteína cliente de Hsp90.

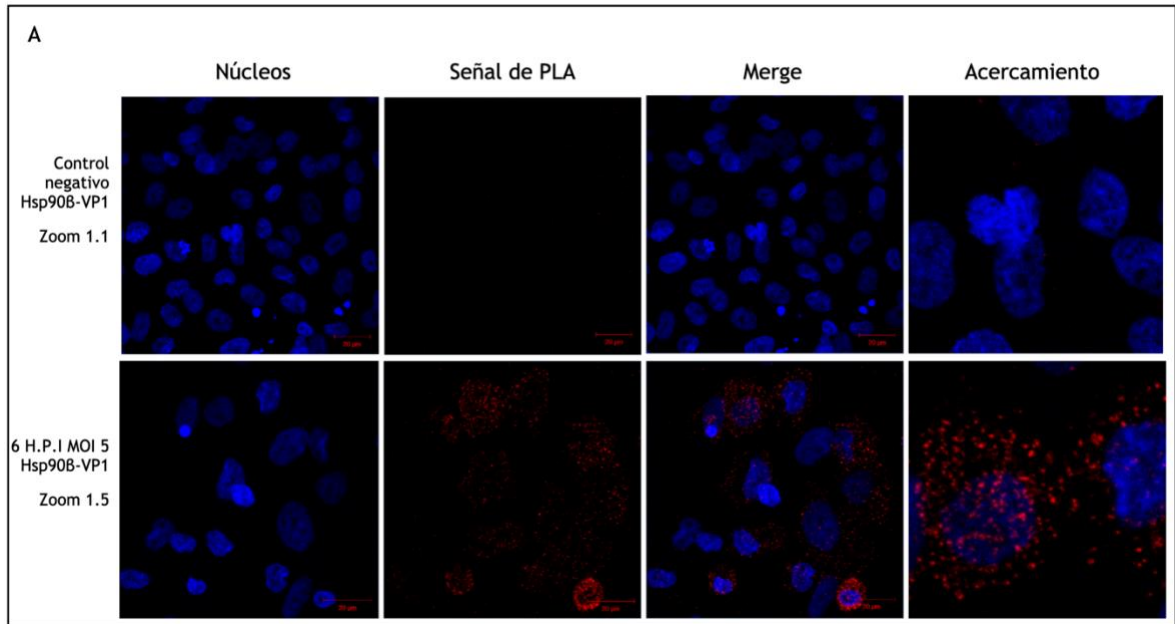


Figura 23 La proteína VP1 interactúa con Hsp90.

Células CrFk se infectaron con la cepa URB de FCV a una M.O.I de 5 y se dejó progresar la infección 6 horas. Ambos ensayos se realizaron en presencia de anticuerpo anti-Hsp90 y A) en ausencia y B) en presencia del anticuerpo anti-VP1. El experimento se evaluó por microscopía confocal, utilizando la proyección máxima, de acuerdo a las indicaciones del experimento de PLA, con un microscopio Zeiss LSM700.

La vía de autofagia no es responsable de la degradación de VP1

Al corroborar la interacción de Hsp90 con VP1 y que el efecto de la inhibición de la chaperona no modula negativamente la producción ni traducción del sgRNA, quisimos evaluar las principales vías de degradación: la autofagia y el sistema ubiquitina-proteosoma.

Para determinar si VP1 se degradaba a través de la vía de autofagia, se decidió inhibirla mediante el uso de el inhibidor Cloroquina (CQ) ya que a pesar de que su mecanismo de acción no está del todo claro, se sabe que es un inhibidor de la fusión autofagosomas - lisosomas e/o impide la acidificación lisosomal y por lo tanto la degradación de su contenido (Ye, Chen *et al.* 2016), por lo que en caso de que VP1 se degradara por esta vía, al inhibirla podríamos observar los niveles basales de la proteína VP1.

Nuevamente se realizaron ensayos de MTT para evaluar la viabilidad de las células CrFK en presencia de CQ a las concentraciones de 25, 50, 75, 100 y 150 μM (Figura 24).

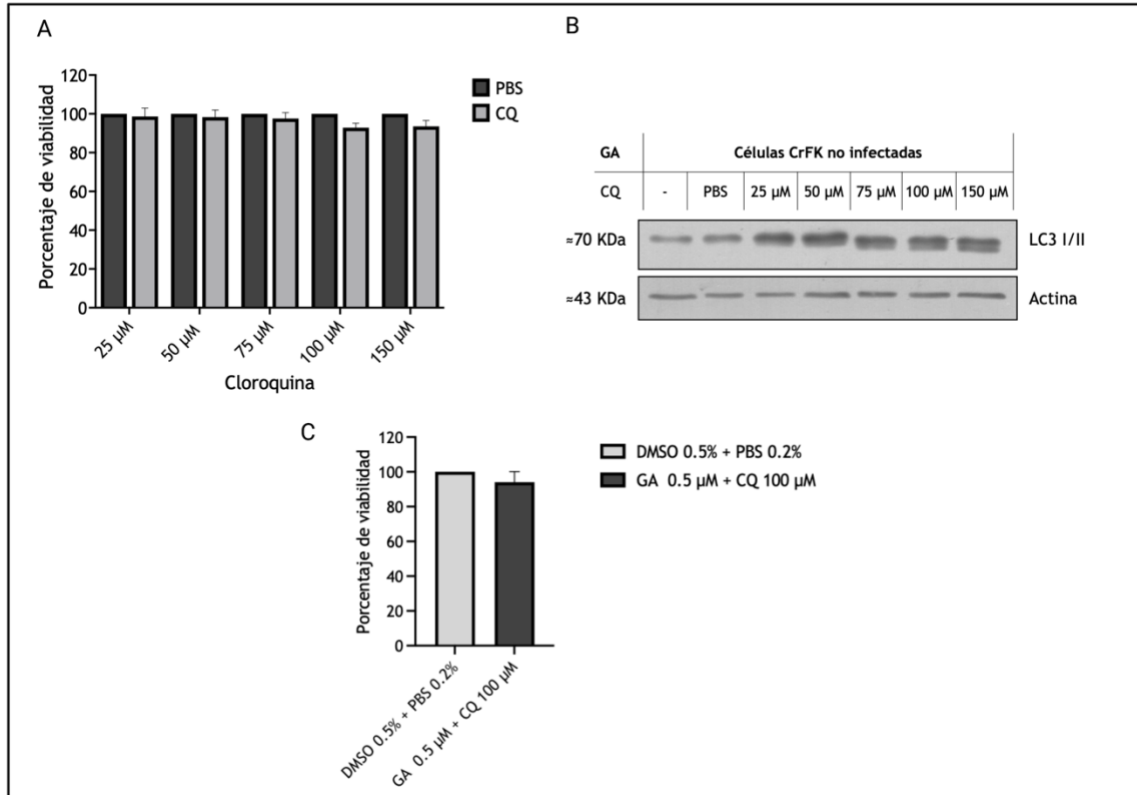


Figura 24 El tratamiento con CQ no afecta la viabilidad de células CrFK.

A) Células CrFK se trataron con diferentes concentraciones de CQ durante 6 horas y la viabilidad celular se determinó mediante ensayos de MTT. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes de MTT. B) Se realizaron ensayos de MTT combinando GA a 0.5 μM y CQ a 100 μM para evaluar el efecto de la combinación de los fármacos en la viabilidad de células CrFK, se realizaron 3 experimentos independientes y se analizaron con el software GraphPad Prism 9 C) Para corroborar la inhibición de la actividad de autofagia se realizaron extractos proteicos de las células tratadas y la proteína LC3 I/II se determinó por ensayos de western blot. Se muestra una imagen representativa de 3 ensayos.

Ninguna de las concentraciones utilizadas durante el ensayo de MTT tuvieron un efecto negativo en la viabilidad de las células CrFK; sin embargo, la respuesta al fármaco varía dependiendo de la línea celular. Es por ello que se decidió corroborar la actividad inhibitoria de la autofagia mediante la detección de los niveles de la proteína asociada a microtubulos de cadena ligera 3B (LC3 I/II) (Mizushima y Yoshimori 2007). En las células no infectadas y tratadas con las

diferentes concentraciones de CQ utilizadas en el ensayo de MTT pudimos observar la acumulación de LC3 II a partir de la concentración de 25 μM . Decidimos utilizar la concentración de 100 μM porque de acuerdo con nuestros ensayos de MTT no tiene un efecto negativo sobre la viabilidad celular y la acumulación de LC3 II es más evidente (**Figura 24**, panel B). Una vez que se eligió la concentración a utilizar de CQ se evaluó la viabilidad celular combinando CQ/GA (Fig. 21C). De manera paralela, se realizaron los ensayos con los vehículos de ambas drogas, PBS 1X y DMSO respectivamente (**Figura 24**, panel C).

Para evitar los posibles efectos pleiotrópicos de la administración de CQ, se decidió agregar la droga justo después de la hora de adsorción viral, al mismo tiempo que GA. Como control se realizaron los mismos experimentos tratados con los vehículos de las drogas (**Figura 25**).

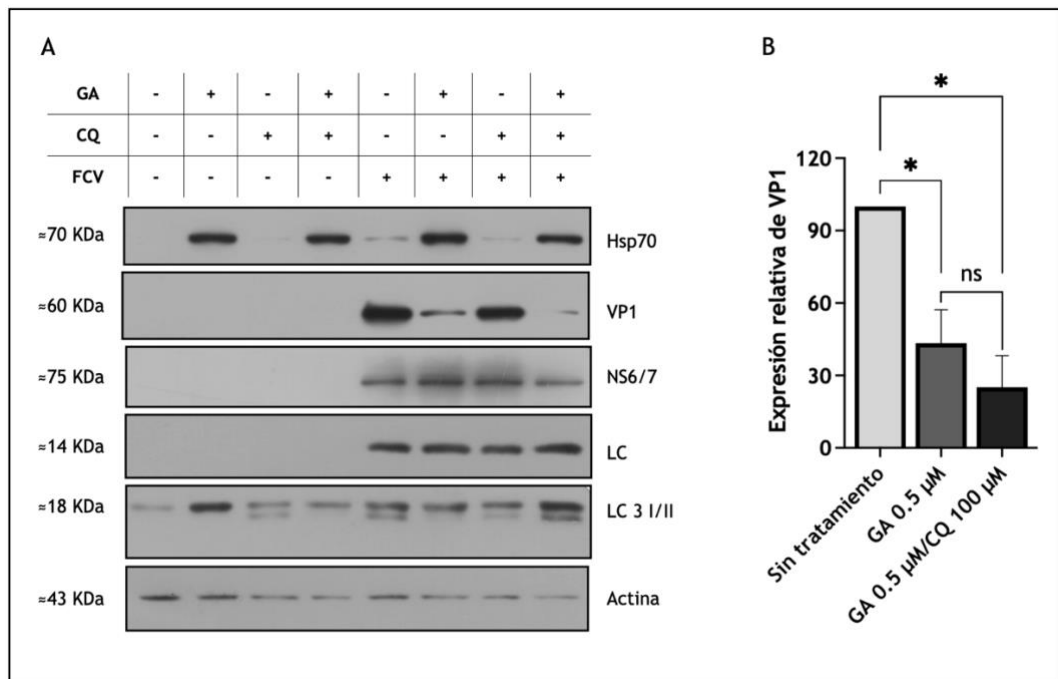


Figura 25 La inhibición de la autofagia no recupera los niveles basales de VP1.

Células CrFK a una confluencia del 80% se infectaron con la cepa URB de FCV a unas M.O.I de 5, una vez terminada la hora de adsorción viral, se agregó CQ y GA a concentraciones de 100 μM y 0.5 μM , respectivamente. A las 6 horas realizaron extractos proteicos totales con RIPA. A) Mediante western blot se analizaron los niveles de VP1, NS6/7 y LC. Hsp70 y LC 3 I/II se utilizaron como controles de actividad de GA y CQ respectivamente. Se realizaron 3 experimentos independientes, se muestra una imagen representativa de los resultados. B) Para el análisis estadístico de la expresión del VP1 se utilizó el software Graphpad

Prism 9, se utilizó la prueba estadística T-Student para comparar los niveles de VP1 en células tratadas con GA y tratadas con GA/CQ contra el control. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $*p < 0.05$.

Los niveles de VP1 en las muestras tratadas solamente con CQ no se modifican de manera significativa. Nuevamente detectamos la expresión de VP1 en las células infectadas, y la degradación en las células tratadas con GA. Sin embargo, cuando tratamos a las células con GA y CQ, los niveles de la proteína VP1 no se restablecen, indicando que la degradación de VP1 cuando Hsp90 está inactiva no ocurre por esta vía. Como control de infección se muestra a las proteínas NS6/7 y LC, cuyos niveles no se modifican en presencia de GA, indicando que el efecto es específico para VP1 y que esta vía no es indispensable para la replicación viral. Como control de la actividad farmacológica de GA nuevamente se muestra la expresión de Hsp70 y como control de la actividad de CQ se muestra el incremento de la proteína LC3 II.

La inhibición de la vía proteosomal tiene un efecto negativo en la replicación de FCV

La otra vía común de degradación de proteínas cliente de Hsp90 cuando la chaperona está inactiva, es el sistema de ubiquitina-proteosoma, un complejo proteolítico encargado de realizar una proteólisis selectiva, cuya actividad catalítica se encuentra en sus subunidades B1, B2 y B5 que tienen actividad proteolítica tipo caspasa, tipo tripsina y tipo quimiotripsina, respectivamente (Saha, Oanca *et al.* 2020).

Una de las herramientas para estudiar la especificidad de la actividad catalítica del proteosoma, son los aldehídos peptídicos cortos como el MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) (Tsubuki, Saito *et al.* 1996, Harer, Bhatia *et al.* 2012). MG132 se une de manera reversible a la subunidad B5 en un intervalo nanomolar, por lo que inhibe de manera específica la actividad enzimática tipo quimiotripsina del proteosoma; sin embargo, a concentraciones más elevadas, en el rango micromolar, puede unirse a las subunidades B1 y B2 (Tsubuki, Saito *et al.* 1996, Albornoz, Bustamante *et al.* 2019).

Para explorar la posibilidad de que VP1 estuviera siendo degradada vía proteosomal cuando la actividad de Hsp90 se encuentra inhibida, se decidió utilizar al MG132. Para esto, se realizó inicialmente un ensayo de viabilidad por MTT utilizando concentraciones de MG132 de 10 - 50 μM . Se decidió utilizar una concentración de 25 μM , ya que está reportada en la bibliografía como capaz de inhibir la actividad del proteosoma (hoja técnica de MG-132 #2194) y no afecta la viabilidad de las células CrFK, la cual se mantiene por encima del 90%. Al igual que en los ensayos de inhibición de la autofagia, se realizó un ensayo de MTT para asegurar que la combinación de MG132 con GA no tendría un efecto negativo en la viabilidad celular (**Figura 26**).

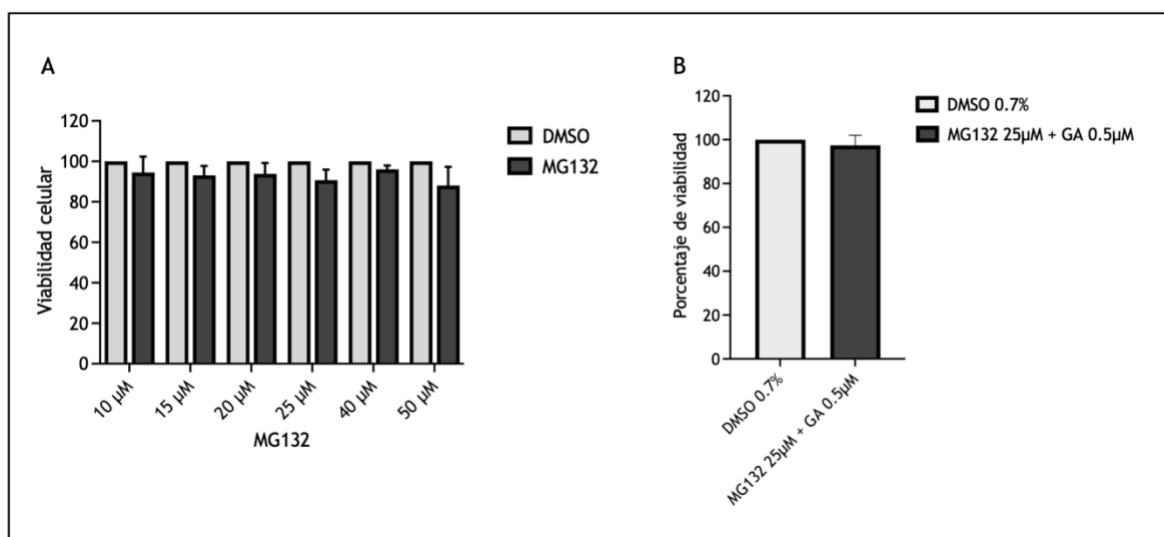
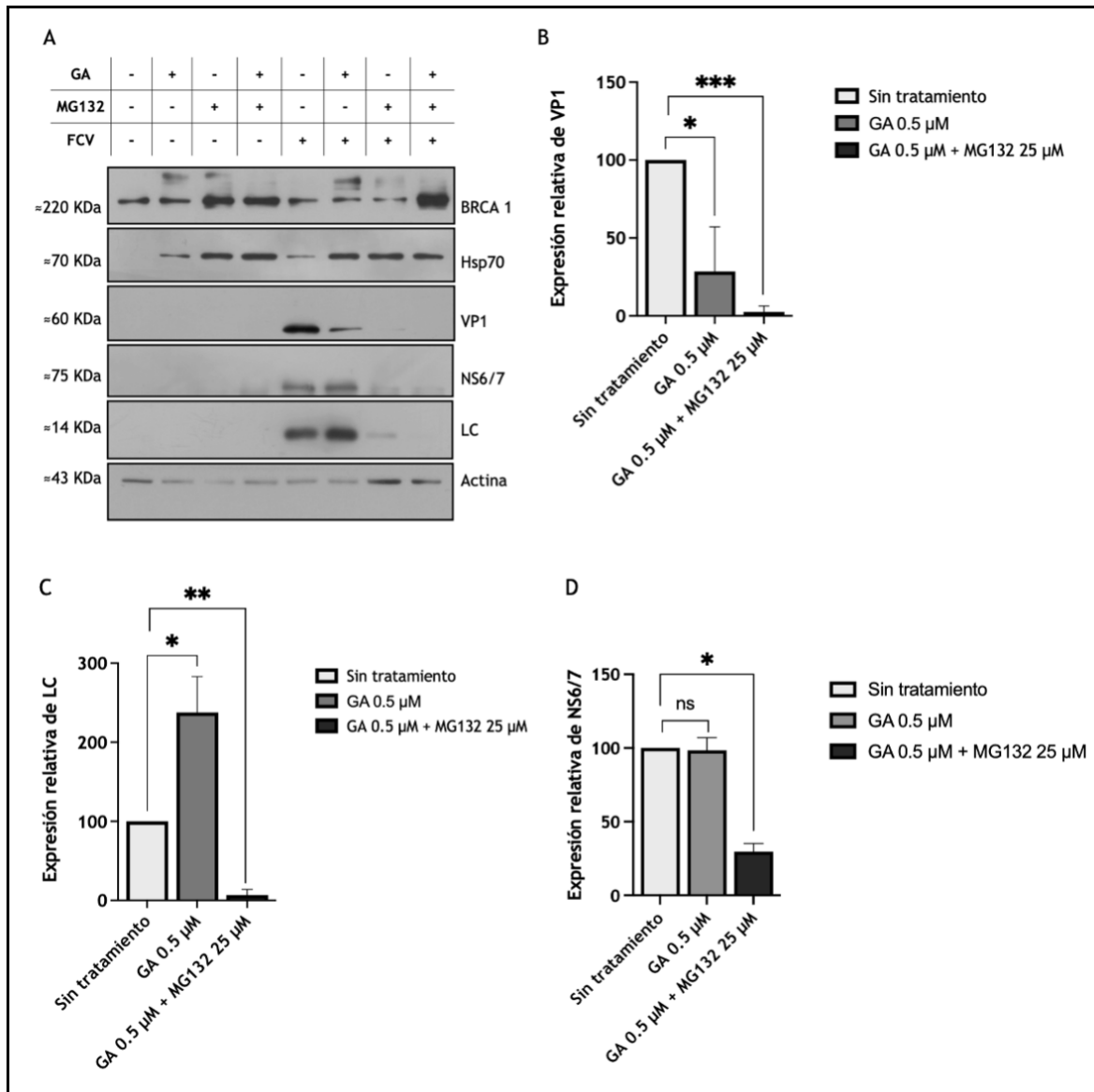


Figura 26 El tratamiento con MG132 solo o combinado con GA no afecta la viabilidad de células CrFK. A) Células CrFK a una confluencia del 80% fueron tratadas con MG132 en concentraciones de 25 - 150 μM durante 11 horas.. Se muestra un promedio de tres experimentos independientes. B. Células CRFK se trataron con 25 μM de MG132 2 horas y se agregó la GA a una concentración de 0.5 μM durante 9 horas adicionales. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes. Los datos se analizaron y graficaron con el software Graphpad Prism 9.

Una vez determinado que la viabilidad celular no se afecta en presencia de MG132 a 25 μM y GA a 0.5 μM , decidimos analizar la inhibición del proteosoma en células infectadas para determinar si la proteína VP1 cuando Hsp90 se encuentra inactiva, se degrada por vía proteosomal. Se decidió utilizar un pretratamiento de

2 horas con MG132 y añadir GA a tiempo cero (T0) como en los experimentos anteriores. Como control de la actividad farmacológica de MG132 se utilizó a la



proteína BRCA1. Esta proteína es degradada por proteosoma y, de acuerdo con datos no publicados de nuestro grupo de trabajo, se degrada durante el ciclo de infección de FCV, por lo que su presencia en células infectadas confirma la actividad de MG132 a la concentración elegida de 25 μM .

Figura 27 La inhibición del proteosoma no recupera los niveles basales de VP1.

A) Células CrFK tratadas con MG132 durante 2 horas de infección con la cepa URB de FCV y tras 1h de adsorción viral, se trataron con MG132 a una concentración de 25 μM y GA a 0.5 μM . A las 6 horas post-infección, se recolectaron las células y se obtuvieron extractos proteicos totales con RIPA, Mediante ensayos de western blot se analizaron los niveles de VP1, NS6/7 y LC. Como controles de la actividad de MG132 se

utilizó la proteína BRCA1; como control del funcionamiento de GA, se utilizó a Hsp70 y como control de carga la Actina. Se realizaron 3 experimentos independientes y se muestra una imagen representativa. Para el análisis estadístico de la expresión del B) VP1 C) LCy D) NS6/7. Para el análisis estadístico se utilizó el software Graphpad Prism 9. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Al igual que en los experimentos anteriores, observamos una reducción en los niveles de VP1 en presencia de GA en comparación con los observados en la infección sin fármacos, como era de esperarse. Sin embargo, al inhibir la actividad del proteosoma con MG132 tanto en ausencia como en presencia de GA, no se evita la degradación de VP1, como se hipotetizó, sino que, por el contrario, no fuimos capaces de detectarla en ninguna de las dos condiciones. Sorprendentemente, y al contrario de lo que ocurre con la inhibición de la autofagia mediante el tratamiento con CQ, la inhibición del proteosoma con MG132 en presencia y ausencia de GA también disminuyó los niveles de la proteína temprana NS6/7 y los de la proteína tardía LC de manera significativa, sugiriendo que la actividad del proteosoma es indispensable durante la replicación del FCV para la producción de proteínas tanto tempranas como tardías. Hsp70 se utilizó nuevamente como control de la actividad farmacológica de GA y también de MG132, y BRCA1 para la de MG132, ya que la inhibición del proteosoma enciende la llamada respuesta ante proteínas mal plegadas (*Unfolded Protein Response*), y dentro de las moléculas de responden a este estímulo de estrés se encuentra Hsp70 (Oroń, Grochowski *et al.* 2022).

A diferencia de lo que observamos en el experimento en el que inhibimos la vía de autofagia con CQ, al inhibir proteosoma se afecta la producción de la proteína temprana NS6/7 y de la proteína LC. Éste efecto podría deberse a un defecto en la entrada viral, porque la droga se administró dos horas antes de iniciar la infección, o bien, a que el FCV necesita de un proteosoma activo para poder llevar a cabo su ciclo de replicación de manera eficiente, como se ha reportado para otros virus, en los que se ha demostrado que requieren de un proteosoma activo para poder enviar a degradación factores celulares que interfieran con su replicación/traducción (Scheffner, Werness *et al.* 1990).

La inhibición de la vía proteosomal impide la replicación viral

Para explorar esta posibilidad, buscamos proteínas susceptibles a degradación por proteosoma que dentro de sus actividades descritas se encontrara la de regular negativamente la traducción viral. La proteína estimuladora de los genes de interferón STING (*Stimulator of Interferon Genes*) cumple con esos dos requisitos. STING es una proteína sensora que se encarga de detectar la presencia de virus de DNA a través de la proteína nucleotidiltransferasa conocida como c-GAS. La vía de c-GAS coordina una respuesta en la que se induce la activación de factores de transcripción proinflamatorios, que promueven la respuesta de interferón (IFN) (Franz, Neidermyer *et al.* 2018). Si bien su papel más conocido en la respuesta antiviral es contra los virus de DNA, recientemente se ha demostrado que ante infecciones por virus de RNA, es capaz de inhibir la traducción viral y frenar así su replicación (Franz, Neidermyer *et al.* 2018). Por estos antecedentes, quisimos evaluar el comportamiento de la proteína STING durante el ciclo de replicación de FCV. Para ello, se infectaron monocapas de células CRFK con el FCV a una M.O.I. de 5 y los niveles de STING se determinaron a 1, 3, 6 y 9 H.P.I mediante ensayos de western blot (Figura 28)

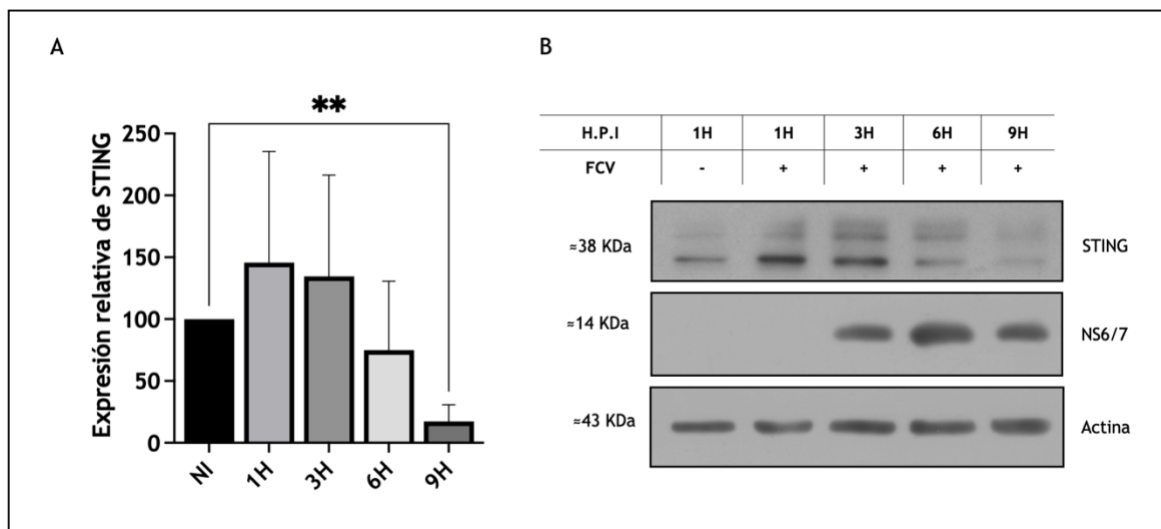


Figura 28 La proteína STING se degrada durante el ciclo de infección de FCV.

A) Células CrFK se infectaron con la cepa URB de FCV, por 1, 3 6 y 9 horas. Las células se cosecharon y se realizaron extractos proteicos totales. A) Mediante ensayos de western blot se determinó la presencia de

*STING NS6/7 indica la infección y actina se utilizó como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico de la expresión de STING se utilizó el software Graphpad Prism 9. *p<0.01.*

La proteína STING se detecta como dos bandas de 42 y 38 kDa, que corresponden a la proteína completa y a sus isoformas respectivamente (Rodríguez-García, Olagüe *et al.* 2018). Estas bandas al parecer, muestran una tendencia a aumentar a la 1 y 3 H.P.I., aunque esto no resultó estadísticamente significativo. Sin embargo, a partir de las 6 y hasta las 9 H.P.I., se observa una degradación de ambas bandas, siendo más evidente en la de 42 kDa, que corresponde STING completa. Aunque existe una reducción de los niveles de STING desde las 6H.P.I., esta únicamente resultó estadísticamente significativa a las 9 H.P.I., indicando que STING se degrada a tiempos tardíos durante el ciclo de replicación de FCV. La detección de la proteína NS6/7 a partir de las 3 H.P.I. y el aumento de sus niveles a las 6 y 9 H.P.I. indica la progresión de la infección. Actina se utilizó como control de carga.

Discusión

El *Calicivirus felino* ha sido una herramienta invaluable en el estudio de la biología de la familia *Caliciviridae*. La disponibilidad de células permisibles a la infección y fácilmente cultivables permitió el establecimiento de sistemas de genética reversa y la identificación de receptores funcionales lo que contribuyó en gran medida a comprender mejor la biología de la familia viral. De igual manera, el estudio *in vitro* de la infección por FCV ha proporcionado una gran cantidad de información acerca de los factores celulares de los que depende la replicación del genoma viral y la traducción de sus proteínas.

Los factores celulares involucrados en el ciclo de replicación son muy variados, nuestro grupo de trabajo y otros han contribuido de manera importante en la identificación de proteínas celulares implicadas principalmente en la regulación traduccional. Las proteínas celulares identificadas no sólo han sido las que canónicamente están involucradas en la regulación traduccional de los mRNAs celulares sino también las denominadas ITAFs (por sus siglas en inglés *Internal Translation Associated Factors*), descritas inicialmente como factores reguladores de la traducción interna de los picornavirus, pero que actualmente se sabe que se asocian al RNA de otros virus y participan en la regulación de procesos como la traducción y la replicación del RNA viral (Goodfellow, Chaudhry *et al.* 2005, Chaudhry, Nayak *et al.* 2006, Karakasiliotis, Vashist *et al.* 2010, Hernandez, Sandoval-Jaime *et al.* 2016).

El efecto de la respuesta de choque térmico sobre la replicación viral y particularmente su asociación con el control de la apoptosis (Alvarez-Sanchez, Cancio-Lonches *et al.* 2015) sentó las bases en nuestro laboratorio para explorar a mayor profundidad el papel de las proteínas de choque térmico durante el ciclo de replicación del FCV (Alvarez-Sanchez, Cancio-Lonches *et al.* 2015). Aunado a antecedentes de otros grupos que trabajan con otros miembros de la familia *Caliciviridae* (Vashist, Urena *et al.* 2012, Vashist, Urena *et al.* 2015) y a resultados no publicados de nuestro propio laboratorio (Palafox 2015), el papel de Hsp90 se empezó a perfilar como particularmente importante.

La función más conocida de la proteína Hsp90, es la de chaperona molecular ya que fue identificada inicialmente como una proteína de respuesta a estrés y se sabe que es una de las proteínas más abundantes de la célula (Yim, Prince *et al.* 2016). Evolutivamente, la familia de Hsp90 es una de las más conservadas, ya que se han descrito miembros en todos los reinos estudiados, salvo en *Archaea* (Chen, Zhong *et al.* 2006), por lo que no es de sorprender la gran dependencia que diferentes familias virales muestran por esta chaperona (Geller, Taguwa *et al.* 2012).

Dentro del contexto de las infecciones virales, existen dos tipos de proteínas que comúnmente son clientes de Hsp90, las polimerasas virales y las proteínas estructurales, revisado en: (Geller, Taguwa *et al.* 2012)

En este trabajo, inicialmente demostramos que el FCV requiere de Hsp90 para lograr un ciclo de replicación eficiente, ya que al inhibir la actividad de Hsp90, la producción de partículas virales se reduce en aproximadamente 1.5 órdenes de magnitud en escala logarítmica, comparado con el control tratado con el vehículo de la droga (**Figura 19**). Decidimos evaluar el efecto de la inhibición de Hsp90 sobre dos tipos de proteínas: 1) la proteína temprana NS6/7, una proteína que se traduce del ORF1 como parte de una poliproteína codificada por el RNA genómico y 2) la proteína mayoritaria de la cápside VP1, que a pesar de estar codificada en el RNA genómico, únicamente se traduce a partir del RNA subgenómico en las etapas tardías de la infección como un precursor LC-VP1. El precursor LC-VP1 es procesado por la proteinasa/polimerasa viral para producir a la proteína VP1 madura que por tener la capacidad de autoensamblarse, debe generarse después de la síntesis de los RNA genómicos virales para que éstos sean integrados durante el ensamblaje de la cápside viral.

La inhibición de la actividad de Hsp90 no tuvo ningún efecto sobre los niveles de la proteinasa/polimerasa NS6/7; sin embargo, sí correlaciona con la reducción de los niveles de la proteína VP1. En este punto, se analizaron dos posibilidades: la reducción en los niveles de VP1 podía deberse a un mal plegamiento y consecuente degradación de la proteína, como ocurre con proteínas estructurales de otros virus (Geller, Vignuzzi *et al.* 2007); o bien, a una regulación de la síntesis,

estabilidad o expresión del RNA subgenómico que dependiera directa o indirectamente de Hsp90. Existen antecedentes no publicados de nuestro grupo de trabajo y de otros grupos que demuestran que Hsp90 se une a los extremos 3' y 5' del RNA de MNV (Vashist, Urena *et al.* 2015). En tanto que, en otros sistemas, se ha demostrado que Hsp90 es capaz de inducir un estado permanente de traducción de RNAs mensajeros celulares (Tsvetkov, Eisen *et al.* 2020), y en el Virus del Mosaico del Bambú, la interacción directa de Hsp90 con una estructura secundaria presente en el extremo 3'UTR del RNA viral mejora de manera específica su replicación (Huang, Hu *et al.* 2012).

Para determinar si Hsp90 está involucrada en la síntesis, estabilidad o traducción del RNA subgenómico del FCV, decidimos detectar por Western blot al precursor LC-VP1. Las proteínas virales tempranas se traducen a partir del ORF1 del RNA genómico, en tanto que la proteína VP1 y la proteína LC están codificadas en el ORF2 y se traducen de manera equimolar a partir del RNA subgenómico. La ausencia del precursor LC-VP1 en células infectadas y tratadas con el inhibidor de Hsp90 nos permitiría proponer que la chaperona está involucrada en la producción o traducción del RNA subgenómico. Mientras que, detectar al precursor en presencia y ausencia del inhibidor de Hsp90, nos permitiría proponer que Hsp90 está involucrada en la traducción del ORF2 o que se encarga de la estabilidad de VP1.

Nosotros encontramos que los niveles del precursor LC-VP1 detectados por Western blot en presencia del inhibidor de Hsp90 no se reducen, sino por el contrario aumentan de manera estadísticamente significativa en comparación con los niveles del precursor LC-VP1 obtenidos de células no tratadas con GA. Este aumento en los niveles de LC-VP1 correlaciona con un aumento en los niveles de la proteína LC, pero contrasta con la disminución de los niveles de VP1. El aumento en los niveles del precursor LC-VP1 sugieren que Hsp90 podría modular de manera directa o indirecta la traducción del subgenoma viral.

Estos resultados, aunados a la interacción demostrada entre Hsp90-VP1 por el ensayo de ligación por proximidad, sugieren fuertemente que VP1 es cliente de Hsp90, en tanto que el aumento en los niveles del precursor LC-VP1 sugieren que

Hsp90 podría modular de manera directa o indirecta la traducción del subgenoma viral.

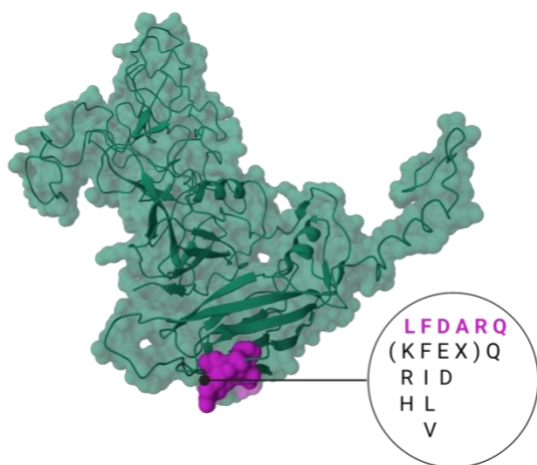


Figura 29 La proteína VP1 tiene un motivo KFERQ-like.

Se analizó la secuencia de la proteína VP1 en busca de un motivo KFERQ-like, se muestra en morado la secuencia; entre paréntesis se muestra el motivo que es capaz de reconocer Hsp70, los paréntesis significan que no importa el orden de los residuos y los residuos que se encuentran en la misma columna vertical son intercambiables[4]. PDB ID: 3M8L.

Al quedar establecido que VP1 es cliente de Hsp90, faltaba por identificar su vía de degradación. Es bien conocido que las proteínas cliente de Hsp90 son degradadas por la autofagia y el proteosoma (Hoter, El-Sabban *et al.* 2018). Se han descrito tres formas principales de autofagia con diferentes formas de seleccionar a sus proteínas cargo (Kaushik y Cuervo 2018), la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas, en la que las proteínas cargo cuentan con un dominio similar a KFERQ (Dice 1990, Kaushik y Cuervo 2018). Al analizar la secuencia de VP1 de FCV, encontramos la presencia de un motivo parecido a

KFERQ, que se ha reportado, es capaz de enviar a degradación a algunas proteínas que lo contienen (Figura 29).

Por este motivo decidimos evaluar si la proteína VP1 era degradada mediante la vía de la autofagia utilizando al inhibidor CQ. No está claro cuál es el mecanismo de acción de CQ ya que se ha demostrado que impide la acidificación de los lisosomas (Fedele y Proud 2020), pero también que imposibilita la fusión de los autofagosomas con el lisosoma (Mauthe, Orhon *et al.* 2018); es probable que el mecanismo de acción sea una sumatoria de ambos efectos y que la prevalencia de uno u otro dependa del tipo celular, de cualquier manera, en nuestros ensayos demostramos la inhibición de la autofagia mediante la detección de la acumulación de la proteína LC3 II (Figura 24). La inhibición de la vía de autofagia con CQ no

favoreció la recuperación de los niveles de VP1 (**Figura 25**) cuando Hsp90 se encuentra inactiva, lo que descarta a la autofagia como el destino final de VP1. Nuestros resultados muestran que ni la proteína LC, ni NS6/7 parecen estar moduladas a la baja o al alta en las células tratadas con CQ. A este respecto recientemente se reportó que FCV induce la degradación por autofagia de RIG-I (el gene 1-inducible por ácido retinóico) como mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Mao, Ye *et al.* 2023). Sin embargo, la utilización de inhibidores de autofagia que afectan las etapas tardías de la vía no parece tener un efecto negativo en la producción de partículas virales, lo que sugiere que la regulación de la vía autofagica durante la infección por el FCV es un proceso complejo modulado durante el ciclo de infección.

La otra probable vía de degradación de VP1 cuando Hsp90 está inactiva, es la vía ubiquitina-proteosoma. Al realizar los experimentos en presencia del inhibidor del proteosoma MG132, observamos que no se recuperan los niveles de VP1, sino que por el contrario, se observa una mucho menor cantidad de VP1 en relación a la detectada en presencia de GA sola. Asimismo, los niveles de proteínas virales tempranas como NS6/7, cuyos niveles no se afectaron en presencia de ninguna de las otras drogas, disminuyeron de manera significativa. Estos resultados sugieren que el proteosoma activo es necesario para una replicación eficiente del FCV.

Nuestros resultados hasta este punto, podemos resumirlos en dos ideas principales: la primera, es que VP1 es una proteína cliente de Hsp90 por lo que cuando la chaperona está inactiva, VP1 es degradada por una vía que no hemos podido determinar; la segunda idea es que existe un factor celular con actividad antiviral que el virus modula negativamente para que la infección progrese, como ocurre en otras infecciones virales en las que proteínas celulares implicadas en la respuesta inmune son enviadas a degradación.

Respecto a este último punto, nosotros sugerimos que existe al menos un factor celular involucrado en la respuesta antiviral que es enviado a degradación proteosomal de manera activa; este factor celular debería ser cliente de Hsp90 y susceptible a degradación en ausencia de su chaperona. Entre los factores

celulares involucrados en la respuesta antiviral que presentan estas características sobresalió la proteína Estimuladora de Genes de Interferón (STING) en nuestra búsqueda bibliográfica, ya que es una proteína involucrada en la respuesta inmune antiviral, es cliente de Hsp90 y se degrada por vía proteosomal (Li, Cai *et al.* 2020, Sato, Li *et al.* 2020, Budroni y Versteeg 2021). Durante las infecciones por virus de DNA, STING activa la vía de interferón, misma que no se activan en la mayoría de las cepas que se han estudiado de FCV; sin embargo, en infecciones por virus de RNA, se empieza a dilucidar su función como represor traduccional (Franz, Neidermyer *et al.* 2018).

Estos antecedentes nos llevaron a estudiar la posibilidad de que la proteína STING fuera modulada durante el ciclo de infección de FCV. Al analizar por Western blot los niveles de STING durante la infección por el FCV, observamos que sus niveles se mantienen constantes durante los dos primeros tiempos analizados del ciclo de replicación (Fig. 25); sin embargo, después de estos tiempos, se observa una tendencia a la baja de los niveles de STING que resulta ser estadísticamente significativa en el último tiempo analizado (**Figura 28**).

Si la proteína STING está involucrada en la regulación de la traducción del RNA subgenómico, reducir sus niveles en tiempos tardíos del ciclo de replicación asegurarían que no haya producción de proteínas estructurales en tiempos tempranos de la infección, en los que todavía no se ha sintetizado el RNA genómico de la progenie viral, lo que favorecerían el autoensamblaje de partículas virales vacías, y al mismo tiempo, aseguraría una traducción eficiente de su RNA subgenómico en tiempos tardíos para favorecer la formación de partículas virales maduras. Esto se sustenta reportes en los que se documenta que al ser STING cliente de Hsp90, su inactivación favorece su degradación vía proteosomal, lo que concuerda con el aumento del precursor LC-VP1 cuando Hsp90 está inactiva (Fig. 19). Asimismo, concuerda con antecedentes de nuestro grupo de trabajo en los que la degradación de STING tiempos tardíos explicaría la inactivación de STAT3 debido a la falta de fosforilación (Tesis de maestría de Landa Cardaña).

Si STING regula negativamente la traducción viral, parece paradójico que se encuentre estable durante los tiempos tempranos de la infección, pero puede

explicarse. Si STING modula negativamente el inicio de la traducción viral, como ha sido propuesto para otros virus de RNA (Franz, Neidermyer *et al.* 2018), podría reconocer las secuencias o estructuras presentes en el extremo 5' del RNA subgenómico, mismas que están conservadas en el ORF 2 del RNA genómico. Esto explicaría por qué a pesar de que este marco de lectura está presente en el RNA genómico, no se produce la VP1. La proteína podría participar en la regulación de la traducción, al favorecer que el ribosoma se suelte del RNA una vez que encuentra el codón de paro, también es posible que su presencia no favorezca ni perjudique la traducción del RNA genómico. Sin embargo, esto es materia de una futura investigación.

Hasta este punto, no podemos asegurar que la proteína STING sea la única responsable de los efectos observados, es probable que existan otros factores celulares involucrados en la respuesta antiviral que podrían ser degradados al inhibir a Hsp90 o cuya degradación pudiera regularse por la infección con el FCV; de la misma manera, al inhibir la actividad proteosomal, STING no es el único factor celular que se ve afectado. Hacen falta otros experimentos para poder demostrar que es STING el factor celular involucrado en los fenómenos que hemos reportado.

Nuestros datos sugieren que la vía de degradación de VP1 en ausencia de la actividad de Hsp90, es la vía proteosomal, sin embargo, ya que el virus necesita de un proteosoma activo durante su ciclo de replicación, determinar si es el proteosoma el encargado de degradar a VP1 requerirá de un sistema libre virus.

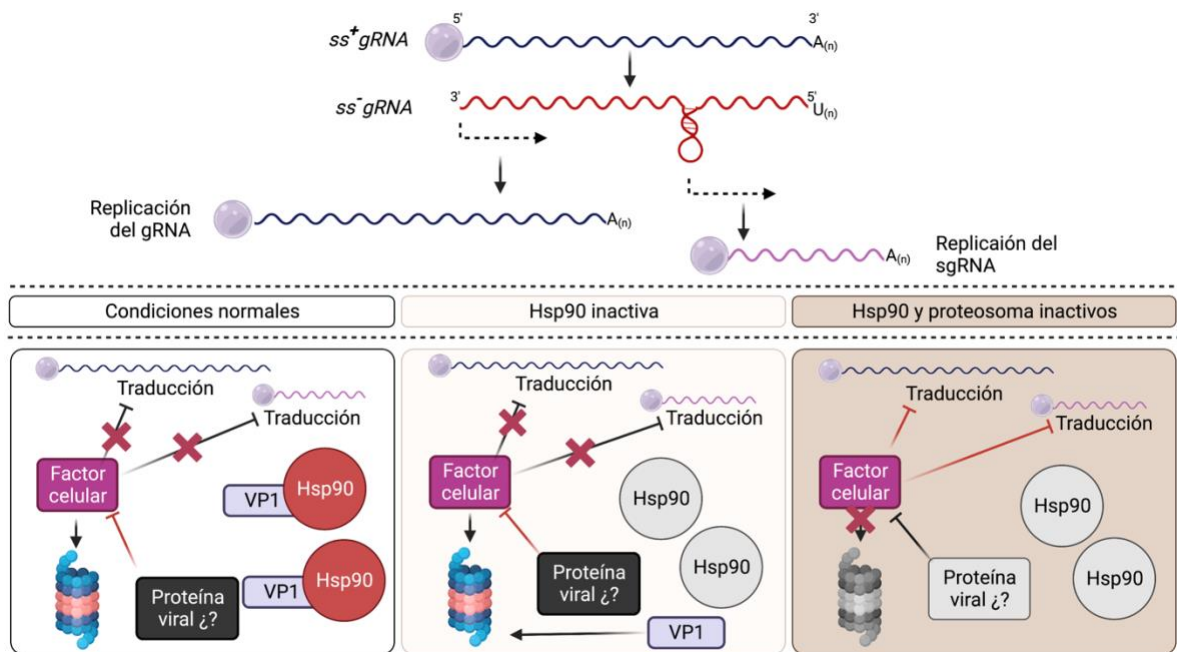


Figura 30 La proteína VP1 se degrada via proteosomal cuando Hsp90 está inactiva.

Se expone el modelo propuesto para explicar el comportamiento de VP1 cuando Hsp90 está inactiva. En el primer recuadro de izquierda a derecha. Se observa la infección por FCV en condiciones normales, VP1 asiste su plegamiento y una proteína viral no identificada promueve la degradación proteosomal de un factor celular involucrado en la respuesta antiviral y capaz de frenar la traducción viral (Franz, Neidermyer et al. 2018). Segundo recuadro de izquierda a derecha, se observa el curso de la infección por el FCV cuando Hsp90 está inhibida; la ausencia de la actividad de chaperona de Hsp90 envía a degradación proteosomal a VP1, en tanto que no se observa un efecto negativo en el resto de las proteínas virales que no son clientes de Hsp90; la ausencia del factor celular (porque también es cliente de Hsp90), facilita la expresión del RNA subgenómico. Tercer y último recuadro de izquierda a derecha: cuando se inhibe la actividad proteosomal junto con la actividad de hsp90, no se recuperan los niveles de la proteína VP1 porque la presencia del factor celular en cantidades mayores desde el inicio de la infección (pretratamiento de dos horas con el inhibidor MG132), bloquea la traducción de las proteínas virales.

Conclusiones

1. Hsp90 se requiere para la producción eficiente del FCV.
2. La proteína VP1, pero no la proteína temprana NS6/7 ni la proteína tardía LC, es cliente de Hsp90.
3. Se requiere de Hsp90 activa para la estabilidad de VP1.
4. La degradación de VP1 cuando Hsp90 esta inactiva no ocurre por la vía de la autofagia.
5. La infección por FCV requiere que la vía de ubiquitina-proteosoma esté activa.

Prospectivas

1. Determinar si VP1 en presencia de Hsp90 inactiva se degrada por la vía proteosomal, mediante la transfección de la proteína VP1 recombinante en presencia de GA.
2. Determinar si STING se une a las regiones 5' terminales del ORF2 presentes en el RNA genómico y subgenómico.
3. Determinar el efecto de la sobreexpresión e inhibición de STING en tiempos tempranos y tardíos de la infección.

Referencias bibliográficas

- Abente, E. J., et al. (2013). "The Feline Calicivirus Leader of the Capsid Protein Is Associated with Cytopathic Effect." Journal of Virology **87**(6): 3003-3017.
- Alam, M. S. (2022). "Proximity Ligation Assay (PLA)." Methods Mol Biol **2422**: 191-201.
- Albornoz, N., et al. (2019). "Cellular Responses to Proteasome Inhibition: Molecular Mechanisms and Beyond." Int J Mol Sci **20**(14).
- Alhatlani, B., et al. (2015). "Functions of the 5' and 3' ends of calicivirus genomes." Virus Res **206**: 134-143.
- Alvarez-Sanchez, C., et al. (2015). "Negative effect of heat shock on feline calicivirus release from infected cells is associated with the control of apoptosis." Virus Res **198**: 44-52.
- Aviner, R. and J. Frydman (2020). "Proteostasis in Viral Infection: Unfolding the Complex Virus-Chaperone Interplay." Cold Spring Harb Perspect Biol **12**(3).
- Bailey, D., et al. (2010). "Feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation." J Gen Virol **91**(Pt 3): 739-749.
- Bakthisaran, R., et al. (2015). "Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology." Biochim Biophys Acta **1854**(4): 291-319.
- Baltimore, D. (1971). "Expression of animal virus genomes." Bacteriol Rev **35**(3): 235-241.
- Barrera-Vázquez, O. S., et al. (2019). "The feline calicivirus leader of the capsid protein causes survivin and XIAP downregulation and apoptosis." Virology **527**: 146-158.
- Bhella, D., et al. (2008). "Structural insights into calicivirus attachment and uncoating." J Virol **82**(16): 8051-8058.
- Bhella, D. and I. G. Goodfellow (2011). "The cryo-electron microscopy structure of feline calicivirus bound to junctional adhesion molecule A at 9-angstrom resolution reveals receptor-induced flexibility and two distinct conformational changes in the capsid protein VP1." J Virol **85**(21): 11381-11390.
- BioRad. "A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection." Electrophoresis. 2023, from https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf.
- Budroni, V. and G. A. Versteeg (2021). "Negative Regulation of the Innate Immune Response through Proteasomal Degradation and Deubiquitination." Viruses **13**(4).
- Burch, A. D. and S. K. Weller (2004). "Nuclear sequestration of cellular chaperone and proteasomal machinery during herpes simplex virus type 1 infection." J Virol **78**(13): 7175-7185.
- Burmeister, W. P., et al. (2015). "Structure determination of feline calicivirus virus-like particles in the context of a pseudo-octahedral arrangement." PLoS One **10**(3): e0119289.

Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.

Carter, M. J., et al. (1992). "Identification and sequence determination of the capsid protein gene of feline calicivirus." Arch Virol **122**(3-4): 223-235.

Caspar, D. L. and A. Klug (1962). "Physical principles in the construction of regular viruses." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **27**: 1-24.

Castellanos-Serra, L., et al. (1999). "Proteome analysis of polyacrylamide gel-separated proteins visualized by reversible negative staining using imidazole-zinc salts." Electrophoresis **20**(4-5): 732-737.

Chase, G., et al. (2008). "Hsp90 inhibitors reduce influenza virus replication in cell culture." Virology **377**(2): 431-439.

Chaudhry, Y., et al. (2006). "Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components." Journal of Biological Chemistry **281**(35): 25315-25325.

Chen, B., et al. (2006). "Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms." BMC Genomics **7**: 156.

Chen, H., et al. (2022). "Reverse genetics in virology: A double edged sword." Biosafety and Health **4**(5): 303-313.

Conley, M. J., et al. (2019). "Calicivirus VP2 forms a portal-like assembly following receptor engagement." Nature **565**(7739): 377-381.

Crandell, R. A., et al. (1973). "Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK)." In Vitro **9**(3): 176-185.

Cubillos-Zapata, C., et al. (2020). "Precise location of linear epitopes on the capsid surface of feline calicivirus recognized by neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies." Vet Res **51**(1): 59.

Davarinejad, H. (2015). "Quantifications of western blots with ImageJ." University of York.

DeBoer, C., et al. (1970). "Geldanamycin, a new antibiotic." J Antibiot (Tokyo) **23**(9): 442-447.

Dice, J. F. (1990). "Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis." Trends Biochem Sci **15**(8): 305-309.

Dunn, S. D. (1986). "Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies." Anal Biochem **157**(1): 144-153.

Escobar-Herrera, J., et al. (2007). "A carboxymethyl-cellulose plaque assay for feline calicivirus." J Virol Methods **146**(1-2): 393-396.

Fastier, L. B. (1957). "A new feline virus isolated in tissue culture." Am J Vet Res **18**(67): 382-389.

Fedele, A. O. and C. G. Proud (2020). "Chloroquine and bafilomycin A mimic lysosomal storage disorders and impair mTORC1 signalling." Biosci Rep **40**(4).

Franz, K. M., et al. (2018). "STING-dependent translation inhibition restricts RNA virus replication." Proceedings of the National Academy of Sciences **115**(9): E2058-E2067.

Fredriksson, S., et al. (2002). "Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays." Nature Biotechnology **20**(5): 473-477.

Geller, R., et al. (2012). "Broad action of Hsp90 as a host chaperone required for viral replication." Biochim Biophys Acta **1823**(3): 698-706.

Geller, R., et al. (2007). "Evolutionary constraints on chaperone-mediated folding provide an antiviral approach refractory to development of drug resistance." Genes Dev **21**(2): 195-205.

Ghasemi, M., et al. (2021). "The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis." Int J Mol Sci **22**(23).

Giannoulis, A., et al. (2020). "Two closed ATP- and ADP-dependent conformations in yeast Hsp90 chaperone detected by Mn(II) EPR spectroscopic techniques." Proceedings of the National Academy of Sciences **117**(1): 395-404.

Gooderham, K. (1984). "Transfer techniques in protein blotting." Proteins: 165-178.

Goodfellow, I., et al. (2005). "Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E." EMBO Rep **6**(10): 968-972.

Green, K. Y., et al. (2002). "Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells." J Virol **76**(17): 8582-8595.

Grenert, J. P., et al. (1997). "The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation." J Biol Chem **272**(38): 23843-23850.

Grove, J. and M. Marsh (2011). "The cell biology of receptor-mediated virus entry." J Cell Biol **195**(7): 1071-1082.

Harer, S. L., et al. (2012). "Proteasome inhibitors mechanism; source for design of newer therapeutic agents." The Journal of Antibiotics **65**(6): 279-288.

Hegazy, M., et al. (2020). "Proximity Ligation Assay for Detecting Protein-Protein Interactions and Protein Modifications in Cells and Tissues in Situ." Curr Protoc Cell Biol **89**(1): e115.

Herbert, T. P., et al. (1996). "Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA." J Gen Virol **77** (Pt 1): 123-127.

Hernandez, B. A., et al. (2016). "Nucleolin promotes in vitro translation of feline calicivirus genomic RNA." Virology **489**: 51-62.

Hoter, A., et al. (2018). "The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease." Int J Mol Sci **19**(9).

Huang, Y. W., et al. (2012). "Hsp90 interacts specifically with viral RNA and differentially regulates replication initiation of Bamboo mosaic virus and associated satellite RNA." PLoS Pathog **8**(5): e1002726.

Johnson, J. E. and J. A. Speir (1997). "Quasi-equivalent viruses: a paradigm for protein assemblies." J Mol Biol **269**(5): 665-675.

Kaiser, W. J., et al. (2006). "Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex." J Gen Virol **87**(Pt 2): 363-368.

Karakasiliotis, I., et al. (2010). "Polypyrimidine tract binding protein functions as a negative regulator of feline calicivirus translation." PLoS One **5**(3): e9562.

Katoh, H., et al. (2017). "Heat Shock Protein 90 Ensures Efficient Mumps Virus Replication by Assisting with Viral Polymerase Complex Formation." J Virol **91**(6).

Kaushik, S. and A. M. Cuervo (2018). "The coming of age of chaperone-mediated autophagy." Nature Reviews Molecular Cell Biology **19**(6): 365-381.

Kumar, P., et al. (2018). "Analysis of Cell Viability by the MTT Assay." Cold Spring Harb Protoc **2018**(6).

Kurien, B. T. and R. H. Scofield (2012). "Common artifacts and mistakes made in electrophoresis." Methods Mol Biol **869**: 633-640.

Lackie, R. E., et al. (2017). "The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases." Front Neurosci **11**: 254.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lawson, J. S., et al. (2019). "Characterisation of Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK) cells as mesenchymal in phenotype." Res Vet Sci **127**: 99-102.

Lee, J. H., et al. (2017). "Structure and Function of Caliciviral RNA Polymerases." Viruses **9**(11).

Li, Z., et al. (2020). "When STING Meets Viruses: Sensing, Trafficking and Response." Front Immunol **11**: 2064.

Lindquist, S. (1986). "The heat-shock response." Annu Rev Biochem **55**: 1151-1191.

Louten, J. (2016). "Virus Structure and Classification." Essential Human Virology: 19-29.

Love, D. N. and M. Sabine (1975). "Electron microscopic observation of feline kidney cells infected with a feline calicivirus." Arch Virol **48**(3): 213-228.

Luttermann, C. and G. Meyers (2007). "A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA." J Biol Chem **282**(10): 7056-7065.

Makino, A., et al. (2006). "Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus." J Virol **80**(9): 4482-4490.

Mao, J., et al. (2023). "Feline Calicivirus P39 Inhibits Innate Immune Responses by Autophagic Degradation of Retinoic Acid Inducible Gene I." Int J Mol Sci **24**(6).

Mauthe, M., et al. (2018). "Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion." Autophagy **14**(8): 1435-1455.

Mayer, M. P. and L. Le Breton (2015). "Hsp90: breaking the symmetry." Mol Cell **58**(1): 8-20.

McClellan, A. J., et al. (2005). "Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations." Nat Cell Biol **7**(8): 736-741.

Mitra, T., et al. (2004). "Mutagenesis of tyrosine 24 in the VPg protein is lethal for feline calicivirus." J Virol **78**(9): 4931-4935.

Mizushima, N. and T. Yoshimori (2007). "How to interpret LC3 immunoblotting." Autophagy **3**(6): 542-545.

Morais, M. C. (2016). "Breaking the symmetry of a viral capsid." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**(41): 11390-11392.

Neill, J. D. (2002). "The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection." Virus Res **87**(1): 89-93.

Nice, T. J., et al. (2013). "A single-amino-acid change in murine norovirus NS1/2 is sufficient for colonic tropism and persistence." J Virol **87**(1): 327-334.

Olsper, A., et al. (2016). "Protein-RNA linkage and posttranslational modifications of feline calicivirus and murine norovirus VPg proteins." PeerJ **4**: e2134.

Oroń, M., et al. (2022). "The molecular network of the proteasome machinery inhibition response is orchestrated by HSP70, revealing vulnerabilities in cancer cells." Cell Rep **40**(13): 111428.

Ostrovsky, O., et al. (2009). "An essential role for ATP binding and hydrolysis in the chaperone activity of GRP94 in cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(28): 11600-11605.

Palafox, M. L. O. (2015). Participación de la proteína de choque térmico 90 en la infección por el calicivirus felino. Infectómica y Patogénesis Molecular. Repositorio Cinvestav, Cinvestav. **Maestría en Ciencias: 42.**

Panaretou, B., et al. (1998). "ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo." Embo j **17**(16): 4829-4836.

Paredes Morales, Y. (2016). Expresión de la proteína mayoritaria de cápside viral (VP1) del calicivirus felino. Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. DSpace Tesis IPN, Instituto Politécnico Nacional. **Licenciatura: 64.**

Pathak, H. B., et al. (2008). "Picornavirus Genome Replication: ROLES OF PRECURSOR PROTEINS AND RATE-LIMITING STEPS IN ORF1-DEPENDENT VPg URIDYLATION*." Journal of Biological Chemistry **283**(45): 30677-30688.

Peñaflor-Téllez, Y. (2019). CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA LÍDER DE LA CÁPSIDE DEL CALICIVIRUS FELINO. Infectómica y Patogénesis Molecular. Repositorio Cinvestav, Cinvestav. **Maestría en Ciencias: 68.**

Peñaflor-Téllez, Y., et al. (2022). "The Feline Calicivirus Leader of the Capsid Protein Has the Functional Characteristics of a Viroporin." Viruses **14**(3).

Peñaflor-Téllez, Y., et al. (2019). "Immune Response Modulation by Caliciviruses." Front Immunol **10**: 2334.

Pöyry, T. A., et al. (2007). "The mechanism of an exceptional case of reinitiation after translation of a long ORF reveals why such events do not generally occur in mammalian mRNA translation." Genes Dev **21**(23): 3149-3162.

Qiagen, A. (2003). "handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins." Qiagen, Chatsworth, Calif, USA.

Radli, M. and S. G. D. Rüdiger (2018). "Dancing with the Diva: Hsp90-Client Interactions." J Mol Biol **430**(18 Pt B): 3029-3040.

Renart, J., et al. (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." Proceedings of the National Academy of Sciences **76**(7): 3116-3120.

Richter, K. and J. Buchner (2011). "Closing In on the Hsp90 Chaperone-Client Relationship." Structure **19**(4): 445-446.

Ritossa, F. (1962). "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila." Experientia **18**(12): 571-573.

Rodríguez-García, E., et al. (2018). "TMEM173 Alternative Spliced Isoforms Modulate Viral Replication through the STING Pathway." ImmunoHorizons **2**(11): 363-376.

Rohayem, J., et al. (2006). "Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol." J Virol **80**(14): 7060-7069.

Rossmann, M. G. and J. E. Johnson (1989). "ICOSAHEDRAL RNA VIRUS STRUCTURE." Annual Review of Biochemistry **58**(1): 533-569.

Saha, A., et al. (2020). "Exploring the Proteolysis Mechanism of the Proteasomes." J Phys Chem B **124**(27): 5626-5635.

Sasaki, T., et al. (1970). "Chrysanthemetic acid. V. Thermal and photo [3, 3] sigmatropic rearrangements in the cis-2, 2-dimethyl-3-isobutenylcyclopropyl isocyanate-3, 6-dihydro-3, 3, 6, 6-tetramethyl-2H-azepin-2-one system." Journal of the American Chemical Society **92**(10): 3192-3194.

Sato, S., et al. (2020). "Regulation of an adaptor protein STING by Hsp90B to enhance innate immune responses against microbial infections." Cell Immunol **356**: 104188.

Scheffner, M., et al. (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." Cell **63**(6): 1129-1136.

Schopf, F. H., et al. (2017). "The HSP90 chaperone machinery." Nat Rev Mol Cell Biol **18**(6): 345-360.

Simmonds, P., et al. (2008). "Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses." Nucleic Acids Res **36**(8): 2530-2546.

Smertina, E., et al. (2021). "Calicivirus Non-structural Proteins: Potential Functions in Replication and Host Cell Manipulation." Front Microbiol **12**: 712710.

Smertina, E., et al. (2019). "Calicivirus RNA-Dependent RNA Polymerases: Evolution, Structure, Protein Dynamics, and Function." Front Microbiol **10**: 1280.

Smith, S. L., et al. (2020). "Temporally separated feline calicivirus isolates do not cluster phylogenetically and are similarly neutralised by high-titre vaccine strain FCV-F9 antisera in vitro." J Feline Med Surg **22**(6): 602-607.

Sosnovtsev, S. and K. Y. Green (1995). "RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity." Virology **210**(2): 383-390.

Sosnovtsev, S. V., et al. (2005). "Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions." J Virol **79**(7): 4012-4024.

Sosnovtsev, S. V. and K. Y. Green (2003). IV, 2. Feline calicivirus as a model for the study of calicivirus replication. Perspectives in Medical Virology, Elsevier. **9**: 467-488.

Sosnovtsev, S. V., et al. (2003). "Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells." Virus Res **94**(1): 1-10.

Sosnovtsev, S. V., et al. (1998). "Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase." J Virol **72**(4): 3051-3059.

Sosnovtseva, S. A., et al. (1999). "Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein." J Virol **73**(8): 6626-6633.

Stuart, A. D. and T. D. Brown (2006). "Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes." J Virol **80**(15): 7500-7509.

Stuart, A. D. and T. D. K. Brown (2007). "Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus." J Gen Virol **88**(Pt 1): 177-186.

Sztuba-Solińska, J., et al. (2011). "Subgenomic messenger RNAs: mastering regulation of (+)-strand RNA virus life cycle." Virology **412**(2): 245-255.

T. Gewirth, D. (2016). "Paralog Specific Hsp90 Inhibitors - A Brief History and a Bright Future." Current Topics in Medicinal Chemistry **16**(25): 2779-2791.

Tada, H., et al. (1986). "An improved colorimetric assay for interleukin 2." J Immunol Methods **93**(2): 157-165.

Taipale, M., et al. (2010). "HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(7): 515-528.

Taldone, T., et al. (2009). "Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors." Bioorg Med Chem **17**(6): 2225-2235.

Teodoro, J. G. and P. E. Branton (1997). "Regulation of apoptosis by viral gene products." J Virol **71**(3): 1739-1746.

Theodoraki, M. A. and A. J. Caplan (2012). "Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins." Biochim Biophys Acta **1823**(3): 683-688.

Towbin, H., et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

Trujillo-Uscanga, A. and A. L. Gutiérrez-Escolano (2020). "Host cell p53 associates with the feline calicivirus major viral capsid protein VP1, the protease-polymerase NS6/7, and the double-stranded RNA playing a role in virus replication." Virology **550**: 78-88.

Tsubuki, S., et al. (1996). "Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine." J Biochem **119**(3): 572-576.

Tsvetkov, P., et al. (2020). "Persistent Activation of mRNA Translation by Transient Hsp90 Inhibition." Cell Rep **32**(6): 108001.

Twarock, R. and A. Luque (2019). "Structural puzzles in virology solved with an overarching icosahedral design principle." Nature Communications **10**(1): 4414.

Vashist, S., et al. (2012). "Identification of RNA-protein interaction networks involved in the norovirus life cycle." J Virol **86**(22): 11977-11990.

Vashist, S., et al. (2015). "Molecular Chaperone Hsp90 Is a Therapeutic Target for Noroviruses." Journal of Virology **89**(12): 6352-6363.

Vashist, S., et al. (2015). "Molecular chaperone Hsp90 is a therapeutic target for noroviruses." Journal of Virology **89**(12): 6352-6363.

Vinje, J., et al. (2019). "ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae." J Gen Virol **100**(11): 1469-1470.

Vongpunsawad, S., et al. (2013). "Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain." J Virol **87**(9): 4818-4825.

Whitesell, L., et al. (1994). "Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(18): 8324-8328.

Wimmer, E. (1982). "Genome-linked proteins of viruses." Cell **28**(2): 199-201.

Yamaki, H., et al. (1995). "Inhibition of the association with nuclear matrix of pRB, p70 and p40 proteins along with the specific suppression of c-MYC expression by geldanamycin, an inhibitor of Src tyrosine kinase." J Antibiot (Tokyo) **48**(9): 1021-1026.

Ye, H., et al. (2016). "Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis." BMC Neurology **16**(1): 178.

Yim, K. H., et al. (2016). "Gambogic acid identifies an isoform-specific druggable pocket in the middle domain of Hsp90 β ." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**(33): E4801-E4809.

Young, J. C., et al. (2003). "Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70." Cell **112**(1): 41-50.

Yunus, M. A., et al. (2015). "The murine norovirus core subgenomic RNA promoter consists of a stable stem-loop that can direct accurate initiation of RNA synthesis." J Virol **89**(2): 1218-1229.