



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en
Ciencias Bioquímicas

Instituto de Biotecnología

Departamento de Genética del Desarrollo y
Fisiología Molecular

**ACTIVIDAD DE CASPASAS INDUCIDA POR
ASTROVIRUS HUMANOS EN CULTIVOS CELULARES Y
SU RELACIÓN CON EL PROCESAMIENTO DE LA
PROTEÍNA ESTRUCTURAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA:

M. EN C. MA. DEL ROCÍO BAÑOS LARA

**DIRECTOR DE TESIS
DR. ERNESTO MÉNDEZ SALINAS**

Cuernavaca, Mor.

Enero, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo está dedicado a mis padres Rebeca y Daniel, y a mis hermanos Kari y Dani, quienes me han brindado todo el apoyo necesario para cumplir esta meta.

Los quiero mucho, los llevo siempre en mi corazón y en mis pensamientos.

Gracias infinitas.

Agradecimientos:

A los integrantes del Grupo Arias-López

A los integrantes del comité tutorial:

Dra. Susana Castro

Dr. Luis Padilla

A los miembros del jurado de examen:

Dra. Helena Porta

Dra. Rosa María del Ángel

Dr. Gustavo Pedraza

Dr. Ramón González

Gracias a la Dra. Susana López y al Dr. Carlos Arias por recibirme en su laboratorio y por las enseñanzas.

En especial, gracias al Dr. Ernesto Méndez por la paciencia y la dedicación en la dirección de este trabajo.

INDICE

ABREVIATURAS	3
ABSTRACT	5
RESUMEN	6
I. INTRODUCCIÓN	
1. Astrovirus	7
1.1 Generalidades de astrovirus	7
1.2 Patogénesis de astrovirus	8
1.3 Organización genómica	9
1.4 Proteínas virales y su procesamiento	11
1.4.1 Proteínas no estructurales	11
1.4.2 Proteínas estructurales	12
1.5 Ciclo Replicativo	15
1.5.1 Entrada de AstV-H	15
1.5.2 Replicación del genoma	15
1.5.3 Ensamble y liberación de partículas virales	17
2. Muerte Celular	
2.1 Tipos de muerte celular	18
2.2 Apoptosis	18
2.2.1 Rutas de activación de apoptosis	20
2.2.1.1 Ruta extrínseca	20
2.2.1.2 Ruta intrínseca	21
2.2.1.3 Apoptosis inducida por estrés de RE	22
2.2.1.4 Apoptosis inducida por gránulos citotóxicos	23
3. Apoptosis inducida por AstVH	26
II. OBJETIVOS	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
IV. RESULTADOS	30
4.1. Papel que juegan diversas caspasas activadas por astrovirus en el procesamiento de su proteína estructural y en su liberación de las células, a través de un mecanismo no lítico	.30
4.2. Resultados adicionales de actividad de caspasas en células Caco-2	31
4.2.1 Identificación de la proteína viral responsable de la inducción de apoptosis	

4.2.2 La infección induce actividad de casp-2 y -6	32	
4.2.3 Actividad de caspasas en la infección en presencia de apoptogénicos		33
4.3 Actividad de caspasas en células Hek-293	35	
4.3.1 Caracterización de la infección en células Hek-293	35	
4.3.2 Actividad de caspasas en células Hek-293	36	
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39	
VI. PERSPECTIVAS	46	
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47	

ABSTRACT

Human Astroviruses (HAstV) are causing agents of gastroenteritis in young children and immunocompromised patients. Caco-2 cells infected with two different HAstV serotypes (4 and 8) showed apoptosis markers and caspases activity. Activity of these enzymes plays an important role in the processing of VP90 at its carboxy-terminus to yield a smaller protein named VP70, which correlated with the release of viral particles to the extracellular media.

This work describes in more detail the correlation of specific casp activity with the processing of VP90 and the release of viral particles, during infection with HAstV-8 in two cell lines, Caco-2 and Hek-293. Different results were obtained in cell lines. It was found that HAstV-8 infection triggers activation of initiator, such as caspases-8, -9 and -4, as well as effector caspases, such as casp-3 and -7 in Caco-2 cells; however, only casp-9, -3 and -4 seem important for the processing of VP90, since only cells transfected with siRNAs specific to these caspase, but not to caspase-8, showed less processing. On the contrary, all active caspases cleaved *in vitro* translated VP90 to VP70, indicating that the protein was substrate for every caspases. Although the release of virus particles was also reduced by silencing caspases-3, -9 and -4, the strongest effect was due to caspases-3 absence, either by silencing it or in the presence of the peptide DEVD-CHO, a potent inhibitor for executioner Caspases-3/7. In spite that executioner caspases-activity was increased, cells did not show changes in their membrane permeability and remained alive for up to 72 hpi, indicating that the release of the virus occurs by a non-lytic mechanism. Caspases-activity increased significantly by transient expression of the non-structural polyprotein nsp1a, more than that observed by expressing nsp1b and VP90, suggesting that nsp1a could promote caspases-activation during HAstV-8 infection. HAstV-8 infection likely sensitizes cells to caspases-activation since this activation is more prominent when infected cells were treated with apoptogenic agents, such as TRAIL and staurosporine.

On the other hand, Hek-293 cells were less permissive than Caco-2. In addition, VP90 was not processed to VP70, and no virus nor VP70 were found in the extracellular media, instead proteins VP27 and VP25 were detected in this fraction, indicating defects during virus entry. HAstV infection triggers caspases-2, -6 and -8, but not caspases-3/7 activity; however none of these enzymes seems to cleave VP90 to VP70 in these cells, since even after treatment with apoptogenic agents, such as staurosporine that enhances caspases-activity, VP90 was not processed, nor release of viral particles was observed.

RESUMEN

Los Astrovirus Humanos (AstVH) son una de las causas más importantes de gastroenteritis en niños pequeños y en pacientes inmunocomprometidos. Las células Caco-2 infectadas con AstVH-4 y -8 son positivas a ciertos marcadores de apoptosis, entre ellos actividad de caspasas. Al parecer esta actividad es importante en la maduración de la partícula de HAstV-8, ya que procesa la proteína estructural VP90 para generar una proteína de menor tamaño llamada VP70; este procesamiento se ha relacionado con la capacidad del virus de salir al medio extracelular.

En este trabajo se describe la activación de ciertas caspasas durante la infección con AstVH-8 en dos líneas celulares, Caco-2 y Hek-293, el papel de estas enzimas en el procesamiento de VP90 y en la liberación del virus, y la proteína viral responsable de la inducción de apoptosis.

En las células Caco-2 la infección con HAstV-8 activa a las caspasa iniciadoras -8, -9 y -4 y a las efectoras -3 y -7. El silenciamiento de la expresión de las caspasa-9, -3 y -4, usando siRNAs, redujo el grado de corte de VP90, mientras que el silenciamiento de la expresión de la caspasa-8 no tuvo ningún efecto. Todas estas caspasas procesaron a VP90 *in vitro*. La salida de virus también disminuyó en las células silenciadas en la expresión de caspasas-3, -4 o -9, sin embargo el efecto fue mayor en el silenciamiento de caspasa-3 y en presencia del inhibidor de caspasas-3/7. La infección no parece alterar la integridad de la membrana celular, sugiriendo que la salida pudiera ser por un mecanismo no lítico.

La expresión transitoria de la proteína viral nsp1a, induce mayor actividad de caspasas que la expresión de las otras proteínas virales, por lo que nsp1a podría ser la responsable de la inducción de apoptosis.

En otro aspecto, la actividad de caspasas en respuesta a la infección parece ser mayor en presencia de ciertos apoptogénicos, como TRAIL o estaurosporina, lo que sugiere que la infección podría sensibilizar a las células a responder mejor a la muerte inducida por estos agentes.

Por otro lado, las células Hek-293 son menos permisibles que las Caco-2 a la infección con HAstV-8, además de que en Hek-293 la VP90 no se procesa a VP70, aún a tiempos tardíos de infección. En el sobrenadante tampoco se detecta a la proteína VP70, pero se detectan VP27 y VP25; estas proteínas no parecen ser de nueva síntesis, sino del inóculo original, lo que sugiere que la entrada del virus a estas células, podría ser menos eficiente que la entrada a las células Caco-2. Finalmente, en células Hek-293, la infección activa a las caspasas-2, -6 y -8, pero no a las caspasas-3/7. La actividad de caspasa-3/7 en células infectadas en presencia de apoptogénicos es mayor que en células sólo infectadas, pero aún en estas circunstancias, no ocurre el procesamiento de VP90 ni se favorece la salida de virus de las células, como ocurre en las células Caco-2.

I. INTRODUCCIÓN

1. Astrovirus

1.1 Generalidades de Astrovirus

Los Astrovirus (AstV) son virus no envueltos de aproximadamente 28-30 nm de diámetro, cuyo genoma está conformado por una sola cadena de RNA de polaridad positiva; poseen una estructura icosaédrica formada de tres proteínas derivadas del procesamiento del producto primario de traducción del ORF2 (del inglés *Open Reading Frame*). Madeley y Crosgrove en 1975, acuñaron el término astrovirus debido a la apariencia de estrella que las partículas virales muestran en microscopías electrónicas (Fig. 1A) [7]. Mediante criomicroscopía electrónica y análisis de imágenes del Astrovirus Humano de serotipo 1 (AstVH-1), se ha establecido que la partícula posee una cápside de apariencia ondulada de 330°A de diámetro con 30 espículas diméricas, con las que el diámetro de la partícula se extiende a 500°A (Fig. 1B).

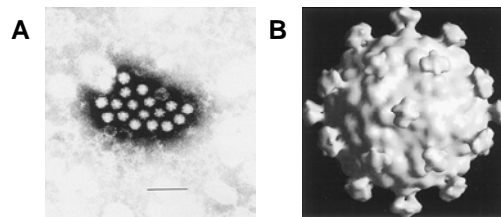


Fig. 1. Micrografía electrónica de AstVH provenientes de muestras fecales. La barra equivale a 100 nm (A). Apariencia de la partícula obtenida por criomicroscopía y análisis de imágenes (B). Tomado de [1].

La familia *Astroviridae* se clasifica en dos géneros: *Mamastrovirus*, que incluye virus que infectan mamíferos y los *Avastrovirus*, que infectan aves. Entre los mamastrovirus se encuentran los astrovirus de bovinos, corderos, venados, cerdos, gatos, ratones, perros, visones, murciélagos y humanos; entre los avastrovirus se encuentran los virus de pollos, patos y pavos. Con base en la secuencia de aminoácidos de la cápside, cada género se divide en dos genogrupos, y cada genogrupo se subdivide en genotipos de diferentes especies de hospedero. Así los AstV Humanos (AstVH) de genotipos 1-8 se encuentran en

el subgrupo A del G1 y AstVH divergentes se ubican los subgrupos A del G2 y B del G2.

1.2 Patogénesis de astrovirus

Los AstVH son una causa importante de gastroenteritis viral en niños pequeños, adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos. Las principales características clínicas de la infección son: diarrea leve que se presenta hasta con 4 evacuaciones por día, por un período de 2 a 3 días, dolor abdominal, vómito y en algunos casos fiebre [1]. La gastroenteritis por AstVH generalmente es una enfermedad autolimitante que no requiere tratamiento específico, sin embargo en algunos casos los pacientes llegan a presentar deshidratación, por lo que es necesaria la reposición de líquidos por vía oral o intravenosa [8].

Recientemente se reportó el hallazgo de AstVH en biopsias de diversos tejidos como: el nervioso (corteza frontal cerebral y tallo cerebral), renal, hepático y linfático (bazo), provenientes de un paciente con encefalitis, lo que sugiere que los AstVH podrían causar infección del tejido nervioso además de los cuadros gastrointestinales típicos [9].

En animales, los AstV también causan diarrea, mientras que en algunas especies de aves causan además otros trastornos. En pollos, el ANV (*Avian Nephritis Virus*) se ha asociado con un síndrome de retardo en el crecimiento y nefritis intersticial aguda; en patos, la infección causa hepatitis y en pavos los AstV causan el síndrome de alta mortalidad llamado por sus siglas en inglés PEMS (*Poult Enteritis Mortality Syndrome*) [1].

Aunque los astrovirus infectan una gran variedad de especies, los modelos animales se limitan a corderos, becerros y pavos, siendo los últimos los animales en los que más se ha estudiado la patogénesis de la infección [10]. En intestinos de pavos infectados con AstV-2 se observaron cambios histológicos sutiles como inflamación ligera (ver adelante) e infiltración de linfocitos [11, 12]. En pavos se observó también que la infección con *Turkey Astrovirus-1* (TAstV-1) disminuyó la actividad de maltasa lo cual provocó mala digestión y mala absorción de disacáridos causando diarrea osmótica [13]. A este respecto, también se ha propuesto que la diarrea podría deberse a un aumento en la permeabilidad intestinal, lo que podría favorecer el incremento en la secreción de fluidos en el

lumen del intestino. El aumento de la permeabilidad intestinal se le ha atribuido a la proteína de la cápside [14].

Por otra parte, en suero de pavos inoculados con TAsV-2 y en intestinos de embriones de pavos, se encontró elevada actividad de TGF-beta. Dado que esta es una citocina inmunosupresora que entre otras propiedades, modula la severidad de enfermedades intestinales, se ha propuesto que la activación de esta citocina podría prevenir la inflamación en la infección con AstV [12]. Por otra parte, en células Caco-2 infectadas con los AstVH-1, 2, 3 y 4 se ha detectado inactivación del complemento. Debido a que el complemento es una ruta de señalización importante en el disparo de la inflamación; se ha propuesto que la inactivación del complemento por la infección, podría prevenir la respuesta inflamatoria [15]. Al parecer, la proteína de la cápside es la responsable de la supresión de la activación del complemento, ya que ésta tiene la capacidad de unirse a C1q y MBL, proteínas determinantes en el inicio de la activación del complemento por la ruta clásica, y por la ruta de las lectinas, respectivamente [16].

1.3 Organización genómica

El genoma de los astrovirus está formado por una cadena sencilla de RNA de sentido positivo; es de aproximadamente 6.8 Kb y está organizado en tres ORFs. Hacia el extremo 5' existe una región no traducible que varía de 11 a 85 nucleótidos (nt) entre los diferentes AstV, posteriormente se ubican el ORF1a y el ORF1b que codifican para las proteínas no estructurales (nsp, del inglés *no structural protein*), las cuales parecen ser importantes en los procesos de transcripción y replicación del RNA. Hacia el extremo 3' del genoma se localiza el ORF2, que codifica para la poliproteína estructural, le sigue una región no traducible de 80 a 85 nt entre los diferentes AstV, y posteriormente una cola de poli (A) (Fig. 2A).

Con base en el análisis de la secuencia de la proteína codificada por el ORF1a, se ha encontrado que la proteína nsp1a, contiene de 5 a 6 motivos de hélices transmembranales y un motivo de serin proteasa. Río abajo de la proteasa, se ha identificado una señal de localización nuclear (SLN) en AstVH y AstV de pollo, sin embargo su funcionalidad no se ha comprobado [17]. Esta supuesta señal de

localización nuclear es similar al extremo carboxilo terminal de la VPg (del inglés *Viral Protein genome linked*) de calicivirus aunque no se ha estudiado su síntesis. Como resultado de este análisis de secuencia, también se presume en nsp1a la presencia de dos estructuras *coiled coil* que podrían participar en la formación de oligómeros [18].

El ORF1b codifica para una poliproteína que contiene motivos de RNA polimerasa dependiente de RNA [18], mientras que el ORF2 codifica para la poliproteína precursora de las proteínas estructurales, que conforman la cápside del virus (Fig. 2A).

1.4 Proteínas virales y su procesamiento.

1.4.1 Proteínas no estructurales.

El producto primario de la traducción del ORF1a es la poliproteína nsp1a. A partir del ORF1a y del ORF1b se traduce la proteína nsp1ab a través de un mecanismo de cambio de fase. Entre estos dos ORFs existe una región de solapamiento que está conservada en AstVH y de animales y presenta dos características importantes: una secuencia heptamérica (AAAAAAC) y río abajo una estructura de tallo y asa. Ambas características son necesarias para el cambio de fase ribosomal durante la traducción del genoma de AstV, produciendo nsp1a y nsp1ab a partir de este mismo RNA. La eficiencia del cambio de fase en la traducción se describió del 5 al 7% en un sistema de traducción in vitro [19], mientras que en un sistema de infección-transfección transitoria, esta eficiencia varió del 25-28% [20].

El procesamiento proteolítico de las proteínas virales no estructurales depende tanto de proteasas celulares como de la proteasa viral. En el caso del AstVH-8, los productos finales del procesamiento son proteínas de 57, 27, 20, y 19 kDa. La proteína de 57 kDa representa la polimerasa y la de 27 kDa es la proteasa (Fig. 2B) [21].

De acuerdo a los diferentes sitios de corte propuestos sobre nsp1a [21-23], Guix y colaboradores dividieron teóricamente a la proteína en cuatro regiones a las que les llamaron nsp1a1-4. La región nsp1a-4 parece tener un papel importante en la replicación del RNA, ya que virus que presentan variabilidad en la secuencia en nsp1a-4 muestran diferencias en la síntesis de RNA genómico y RNA subgenómico [24], además, esta proteína colocaliza con el RNA viral, y se encuentra cerca del Retículo Endoplásmico (RE) [25].

La proteasa de los AstVH pertenece a la familia de las serín proteasas y su sitio catalítico está formado por la triada Ser₅₅₁, His₄₆₁, y Asp₄₈₉. La estructura cristalina de la proteasa de AstVH-1 revela que el monómero está formado por dos dominios plegados en 2 barriles beta, unidos por un interdominio de 20 aminoácidos (aa). El dominio 1 comprende del residuo Ile₄₃₂ al Thr₄₉₄ y está compuesto por seis cadenas beta (a-f) y dos hélices alfa cortas, una en el amino terminal y otra entre las cadenas cl y dl. El dominio 2 comprende del residuo

Lys₅₁₁ al Val₅₈₇ y está formado por 7 cadenas beta (a-g) y una hélice alfa en el carboxilo terminal (Fig. 3) [26]. El sitio de procesamiento de la proteasa viral no ha podido identificarse con claridad. Se ha sugerido que corta entre los residuos Gln₅₆₇-Thr₅₆₈ [27] y entre Val₄₀₉-Ala₄₁₀ y Glu₆₅₄-Ile₆₅₅ [22]. Sin embargo, al probar la actividad de la proteasa recombinante sobre péptidos que contienen cada uno de estos sitios, no se observaron productos de corte. Lo que si se ha determinado es que la proteasa de AstVH tiene actividad hidrolítica sobre sustratos acoplados a Glu y Asp [26].

1.4.2 Proteínas estructurales.

El ORF2 se traduce a un producto de 87-90 kDa que forma las proteínas de la cápside. El análisis comparativo del alineamiento de las secuencia de la proteína de las cápsides de diferentes cepas de AstVH reveló 3 regiones claramente distinguibles: los primeros 415 aminoácidos del extremo amino terminal (con base en la secuencia de AstVH-8) se encuentran muy conservados entre los diferentes serotipos [28, 29]. Dentro de estos 415 aa existen dos regiones hipervariables, pero a pesar de ello, el amino terminal de diferentes tipos de AstV presenta un carácter básico, por lo que se ha propuesto que éste participa en el reconocimiento y ensamble del RNA viral [30]. Después del aminoácido 415 y hasta el 648 existe una región variable entre diferentes serotipos de distintas especies [29]. La región comprendida entre los aminoácidos 649 al 702 (con base en la secuencia de AstVH-8) es hipervariable, sin embargo presenta un carácter ácido bien conservado entre AstV tanto de mamíferos como de aves [28]. De acuerdo a predicciones estructurales, la región conservada del amino terminal podría ser la base de la estructura de la cápside, mientras que la región hipervariable del extremo carboxilo terminal (del aminoácido 415 en adelante) podría formar las espículas del virus. Esta región del extremo carboxilo terminal podría participar en el reconocimiento del receptor celular [31]. El extremo carboxilo terminal (649-702 para AstVH-8) de diferentes serotipos de AstVH y de diferentes especies presenta sitios clásicos de reconocimiento y corte por caspasas, tales como EETD, DEND y DEVD [3] (Fig. 6, apartado 5.1).

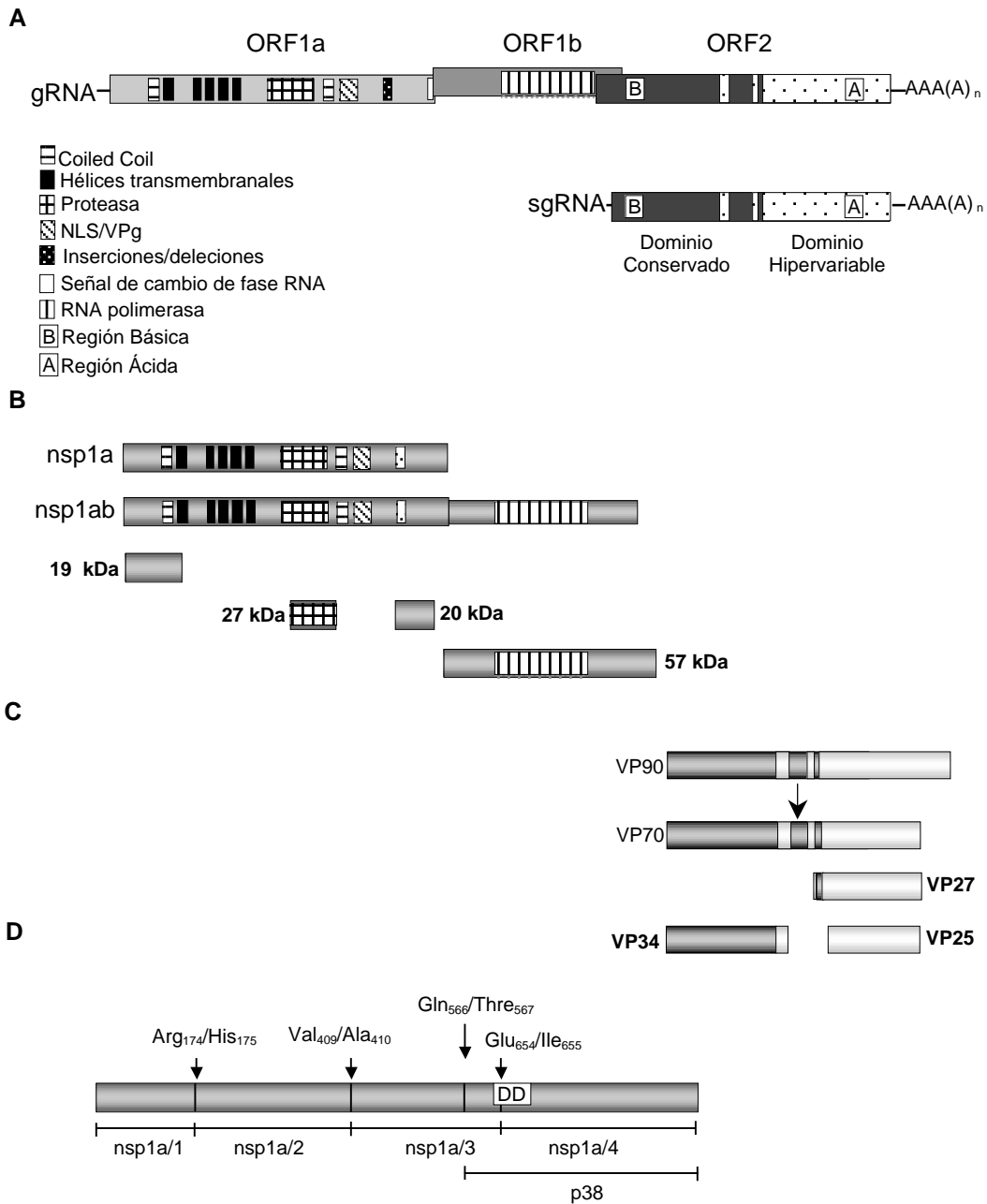


Fig. 2 Organización del Genoma de Astrovirus y elementos que se han determinado con base a su secuencia (A). Productos finales del procesamiento proteolítico de nsp1a y nsp1ab (B) y de VP90 (C). Sitios de corte propuestos sobre nsp1a. DD indica el dominio de muerte putativo. p38, proteína hipotética propuesta por el procesamiento en Gln₅₆₆/Thre₅₆₇ (D).

En la cepa Yuc-8 (AstVH-8) el producto primario de traducción del ORF2 se llama VP90. Esta poliproteína sufre un procesamiento inicial mediado por proteasas celulares (al parecer caspasas, proteasas que se activan en apoptosis, ver más adelante) para rendir un producto de 70 kDa llamado VP70. Los viriones que contienen VP70 son liberados al medio extracelular como partículas maduras [3].

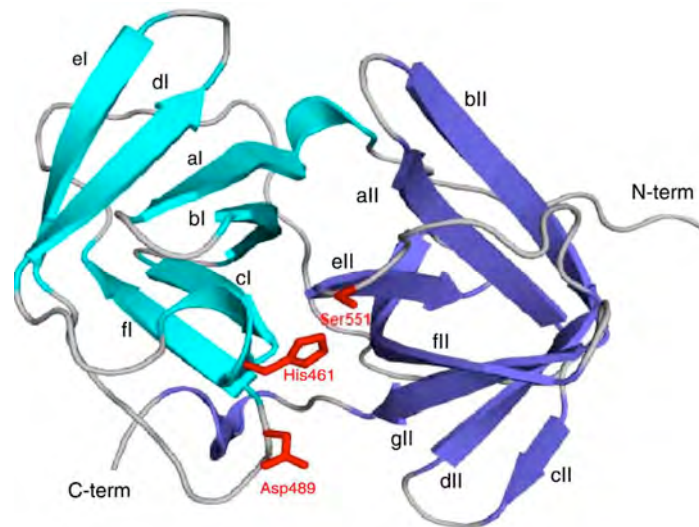


Fig. 3. Estructura cristalina de la proteasa de AstVH-1. Se muestran los extremos carboxilo y amino terminal y en el centro los residuos de aminoácidos que conforman el sitio activo.

En el medio extracelular, VP70 es procesada por tripsina por un mecanismo que involucra varios cortes, generando los productos finales de 34, 27 y 25 kDa (Fig. 2C) [32]. En virus que pertenecen a los serotipos 1-7, los productos son de 32-34, 27-29 y 25-26 kDa respectivamente [33-36]. El procesamiento por tripsina es necesario para hacer al virus completamente infeccioso; no se conoce el mecanismo por el cual la infectividad se incrementa después del tratamiento con tripsina, pero se sabe que se generan cambios estructurales drásticos en las partículas virales, los cuales podrían facilitar la interacción con moléculas celulares durante su entrada [33, 37].

1. 5 Ciclo Replicativo.

1.5.1 Entrada de astrovirus.

La entrada de astrovirus se ha estudiado en dos tipos celulares: Hek-293 (células de riñón de embrión humano) y Caco-2 (células de carcinoma de colon humano). El tratamiento de las células Hek-293 con agentes que afectan el funcionamiento de lisosomas, (cloruro de amonio, dansilcadaverina, metilamina o monesina), bloquean eventos tempranos de la infección, pero no bloquean la unión del virus a la membrana celular. En esta misma línea celular, se han identificado partículas virales dentro de vesículas cubiertas. Los resultados permiten sugerir que AstVH-1 entra a estas células por endocitosis [38]. En las células Caco-2 la infectividad de AstVH-8 disminuye con drogas que afectan el ensamblaje de clatrina (clorpromazina), la polimerización de actina (Jasplakinólido y Citoclacina D), y la acidificación de los endosomas (Bafilomicina). La infección también se reduce en células en las que se bloquea la expresión de clatrina y en aquellas que expresan dominantes negativos de Dinamina-2 y Eps15, proteínas involucradas en la endocitosis mediada por clatrina. Resultados que sugieren que la entrada de AstVH-8 a las células Caco-2, es por endocitosis mediada por clatrina y dinamina (Mendez y colaboradores, manuscrito en preparación).

1.5.2 Replicación del genoma.

Se piensa que la estrategia de replicación del genoma de AstV podría ser similar a la reportada para alfavirus. De acuerdo a este modelo, el RNA genómico (RNAg) podría servir como templado para producir una copia de longitud completa de RNA de sentido negativo o antígenómico (RNAag). Este RNAag podría servir para sintetizar dos tipos de RNA, el RNAg y utilizando un promotor subgenómico el RNA subgenómico (RNAsg) (Fig. 4). El RNAg recién sintetizado es el que se ensambla en las nuevas partículas virales. mientras que el RNAsg codifica para la proteína precursora de la cápside [1].

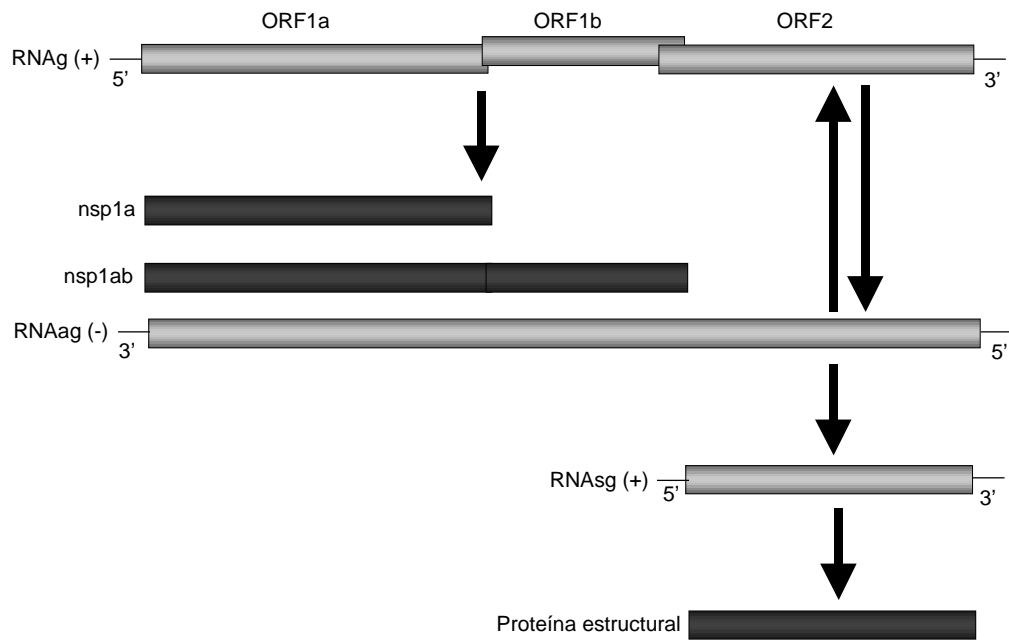


Fig. 4. Replicación del genoma de AstVH. El RNAg sirve como templado para la síntesis del RNAag y del RNAsg, para lo que se requieren las proteínas no estructurales nsp1a y nsp1b, que se traducen a partir del mismo RNAg. A partir del RNAsg se traduce el precursor de la proteína estructural. En gris se representan las diferentes especies de RNA, y en negro a las proteínas. Se indica el sentido y la polaridad de los RNAs.

1.5.3 Ensamble y liberación de partículas virales.

Partículas virales con VP90 se han encontrado tanto asociadas a membranas (^mVP90) como libres en el citosol (^cVP90), mientras que partículas virales con VP70 solo se han encontrado en el citosol (^cVP70). Al parecer la asociación a membranas protege a la VP90 de la digestión por tripsina, lo que sugiere que también podría protegerla del corte por otras proteasas como las caspasas. ^mVP90, pero no ^cVP90 colocaliza con el RNA viral y con las proteínas no estructurales, por lo que se especula que ^mVP90 podría ser la especie de VP90 que inicialmente se ensambla en partículas. Tomando en cuenta estos hallazgos se ha propuesto que las partículas virales se ensamblan con VP90 en asociación con membranas, después se liberan y en el citosol se cortan por caspasas, produciendo partículas con VP70 que son capaces de salir al medio extracelular [2] a través de un mecanismo desconocido. En el medio extracelular, la partícula viral con VP70, como ya se ha mencionado, debe ser procesada por tripsina para hacer al virus completamente infeccioso [32] (Fig. 5)

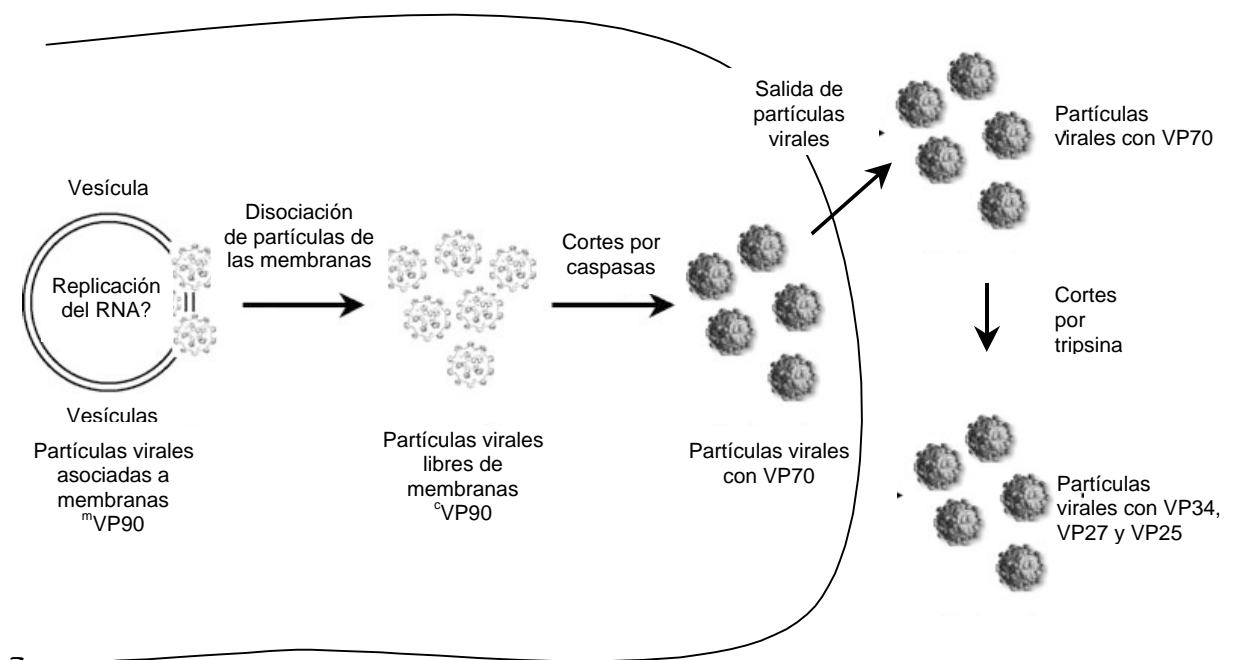


Fig. 5. Modelo propuesto para la morfogénesis de Astrovirus. ^mVP90 se ensambla en partículas virales en asociación con membranas, posteriormente las partículas se liberan de las membranas (^cVP90) y en el citosol, la VP90 de las partículas virales se procesa a VP70 por caspasas. Las partículas virales con VP70 salen al medio extracelular, en el cual la VP70 debe ser procesada por tripsina para hacer al virus completamente infeccioso, rindiendo los productos VP34, VP27 y VP25. Modificado de [2, 3]

2. Muerte Celular.

2.1 Tipos de muerte celular.

La muerte celular es un evento que participa en varios procesos fisiológicos. De acuerdo a la morfología celular la muerte se ha clasificado principalmente en apoptosis, necrosis y autofagia. Las características que definen a cada tipo de muerte se muestran en la tabla 1 [39-43].

Tabla 1. Principales tipos de muerte celular y sus características.

Tipo de muerte celular	Características morfológicas
Apoptosis	Redondeamiento de las células. Reducción de volumen celular y nuclear. Fragmentación nuclear. Condensación de cromatina. Retracción de pseudópodos. Modificación sutil de organelos. Formación de burbujas (<i>blebbling</i>) de la membrana celular. Separación de citoplasma en estructuras rodeadas de membrana celular llamadas cuerpos apoptóticos.
Autofagia	Ausencia de condensación de cromatina. Presencia de numerosas vacuolas de doble membrana en el citoplasma.
Necrosis	Hinchazón (<i>swelling</i>) del citoplasma. Ruptura de la membrana citoplasmática. Hinchazón (<i>swelling</i>) de organelos del citoplasma. Condensación moderada de la cromatina.

Si bien estos tipos de muerte celular han sido estudiados ampliamente, los alcances de este trabajo se limitan solo a la muerte celular apoptótica inducida por AstvH-8.

2.2 Apoptosis.

El término apoptosis fue acuñado por Kerr y colaboradores en 1972 para describir la muerte celular con características morfológicas bien definidas [44]. Este tipo de muerte es importante en varios procesos celulares tales como recambio celular, funcionamiento adecuado del sistema inmunológico, desarrollo embrionario, muerte inducida por fármacos, y eliminación de células infectadas. La apoptosis no adecuada puede derivar en enfermedades degenerativas, daño isquémico, desórdenes autoinmunes y cáncer [45].

La apoptosis es un proceso coordinado y dependiente de energía que involucra la

activación de proteasas celulares llamadas caspasas (cistein aspartato proteasas), que reconocen y cortan cadenas polipeptídicas en secuencias bien definidas, tales como DXXD and XEXD. Estas proteasas interactúan y se activan entre si a través de una cascada compleja, que inicia desde la recepción del estímulo hasta la dismantelación de la célula y su muerte, tras la cual los restos celulares son fagocitados por células vecinas o macrófagos [4].

Las caspasas se expresan en la mayoría de las células como zimógenos. Hasta ahora se han descrito 14 miembros de esta familia, cuya característica es un dominio de proteasa organizado en dos subunidades, una grande de aproximadamente 20 kDa y una pequeña de alrededor de 10 kDa. Los zimógenos, denominados procaspasas, contienen un prodominio de longitud variable. El prodominio y las subunidades se unen por un entrelazador en donde se encuentra el residuo de Asp donde ocurre el corte necesario para la activación de las casps. En las pro-caspasas iniciadoras y las inflamatorias el prodominio es de alrededor de 100 aa, mientras que en las pro-caspasas efectoras es de menos de 30 aa o carecen de él. Las caspasas-8 y -10 poseen un prodominio con motivo DED (del inglés *Death Effector Domain*); mientras que las caspasas-1, -2, -4, -5 y -9 poseen dominio con motivo CARD (del inglés *Caspase Recruitmet Domain*) (Fig. 6). Estos dominios median la interacción homofílica entre las pro-caspasas y las proteínas que funcionan como adaptadores para activarlas. Las caspasas iniciadoras se autoactivan ayudadas de otras proteínas que sirven como plataformas para su oligomerización y autoprosesamiento [46]. Una vez activas estas caspasas activan a las ejecutoras o efectoras, y éstas son las que procesan a los sustratos celulares llevando a la célula a la muerte [47]. Se han reportado alrededor de 300 blancos celulares de caspasas [48].

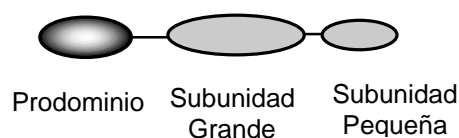


Fig. 6. Organización de las caspasas

2.2.1 Rutas de activación de apoptosis.

Se han descrito principalmente dos grandes vías de inducción de apoptosis: la ruta extrínseca (mediada por ligandos de muerte) y la ruta intrínseca (ocasionada por daño en mitocondria). Una tercera vía de apoptosis se activa cuando las células no se pueden recuperar del estrés de retículo endoplásmico (RE). Existe una ruta adicional que involucra la citotoxicidad mediada por linfocitos T y la participación de granzimas y perforinas. Todas las rutas convergen en una fase de ejecución de muerte celular, efectuada por caspasas efectoras, que da como resultado los cambios morfológicos y bioquímicos característicos ya descritos.

2.2.1.1 Ruta extrínseca.

La ruta extrínseca se dispara por la unión de los receptores de muerte a sus ligandos también llamados de muerte. Estos receptores son proteínas que pertenecen a la superfamilia del TNF, y se encuentran insertas en la membrana celular. Se han descrito varios receptores entre ellos Fas (CD95 o Apo 1), cuyo ligando es FasL (CD95L); TNFR-1 (p55, CD120a) y TNFR-2, cuyo ligando es TNF α ; DR3 (Apo3, WSL1, TRAMP, LARD), DR4 y DR5 (Apo , TRAIL-r2), cuyo ligando es TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) [49].

Una vez que el ligando se une al receptor, se induce la trimerización y el agrupamiento del receptor. A través de los DD (del inglés *Death Domain*) presentes en los ligandos, se unen otras moléculas a las que se unen las pro-caspasa-8 o -10, formando una estructura compleja llamada DISC (del inglés *Death Inducing Signal Complex*) [50], la cual sirve como plataforma para que estas procaspasa se oligomericen y se autoactiven. Posteriormente la pro-caspasa-8 (o la -10) se libera del complejo DISC hacia el citoplasma, y activa a las caspasas-3, -6, y -7 iniciando la fase de ejecución [51, 52].

En cierto tipo de células, la cascada apoptótica disparada por receptores de muerte y la formación del complejo DISC son suficientes para activar caspasas e inducir apoptosis, estas son llamadas células de tipo I. Por el contrario, las células de tipo II amplifican la respuesta apoptótica inducida por receptores de muerte, activando la ruta intrínseca con ayuda de BID (del inglés *BH3 Interacting domain Death agonist*), un miembro de la familia de proteínas Bcl-2. BID es procesado por

caspasa-8, produciendo una forma truncada (tBID), la cual se trasloca a la mitocondria y activa a Bax (*BCL2-associated X protein*) y Bak (*BCL2-antagonist/killer*), promoviendo la activación de la ruta apoptótica intrínseca [53] (Fig. 7).

2.2.1.2 Ruta intrínseca.

La ruta intrínseca se dispara por daño mitocondrial en respuesta a estímulos como agentes quimioterapéuticos, radiaciones UV o estrés oxidativo. Las mitocondrias comprenden una matriz rodeada por una membrana interna (IMM, Inner Mitochondrial Membrane), un espacio intermembranal y una membrana externa (OMM, Outer Mitochondrial Membrane). En la membrana interna residen entre otras, moléculas como ATP sintasa, la cadena transportadora de electrones y el transportador del nucleótido adenina (ANT, *Adenine Nucleotide Transporter*). En condiciones normales, estas moléculas contribuyen en la cadena respiratoria, creando un gradiente electroquímico, que genera una diferencia de potencial eléctrico (potencial de membrana). En la OMM se localiza el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, *Voltage Dependent Anion Channel*), entre otros. En el espacio intermembranal se encuentran el citocromo C (Cit-C), algunas pro-caspasas (como la -2 y la -9) la adenilato cinasa-2, Endo-G, Smac (*Second Mitochondrial Activator of Caspases*, también conocida como DIABLO, (*Direct IAP Binding Protein with Low pI*) y AIF (*Apoptosis Inductor Factor*) [5, 54]. El aumento de la permeabilidad de la OMM (MOMP, del inglés *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) provoca la liberación de estas moléculas al espacio citoplasmático [6], mientras que el aumento de la permeabilidad de la IMM resulta en la pérdida del potencial de membrana.

Se han descrito dos mecanismos para explicar la MOMP. Primero, un poro se abre en la membrana interna, permitiendo el acceso de agua y moléculas superiores a 1.5 kDa. Este modelo llamado PTP (por *permeability transition pore*) involucra la participación de ANT, VDAC y de la OMM. La apertura del poro PT puede dispararse por múltiples estímulos y lleva a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y a la hinchazón de la matriz de la mitocondria. Una vez que el agua entra, la hinchazón es tal que la OMM se rompe y ocurre la MOMP.

El segundo mecanismo propuesto involucra la participación de miembros de la

familia Bcl-2 como Bak y Bax. Se cree que su activación es a través de un cambio conformacional que lleva a su homo-oligomerización en poros lipoprotéicos que se insertan en la OMM y de esa forma promueven el MOMP. La activación de Bax y Bak es modulada por otros miembros de la familia Bcl-2, proteínas como Bcl-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*), Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) y MCL-1 (*Myeloid cell leukemia sequence 1*) [5].

Una vez que ocurre la MOMP las proteínas del espacio intermembranal como el Cit-C se libera hacia el hacia el citosol. El Cit-C se une a APAF-1 (*Apoptotic Peptidase Activating Factor-1*), induciendo un cambio conformacional en éste, que es estabilizado por dATP, este cambio lleva a APAF-1 a su oligomerización en una estructura heptamérica llamada apoptosoma. El cambio conformacional induce también la exposición de su dominio CARD, el cual recluta y dimeriza a la caspasa-9 por medio del motivo CARD presente también en esta caspasa. La pro-caspasa-9 entonces se autocataliza, dando lugar a la caspasa madura y activa. Esta proteasa posteriormente activa a las caspasa efectoras -3 y-7 [55] (Fig. 7).

2.2.1.3 Apoptosis inducida por estrés de RE.

El RE es el organelo donde se lleva a cabo el plegamiento, modificación y dirección de las proteínas recién sintetizadas, y es uno de los principales depósitos de Ca^{+2} intracelular. Las chaperonas moleculares, que residen en el lumen del RE, son las responsables del plegamiento adecuado de proteínas. Bajo ciertas circunstancias, hay sobreproducción de proteínas, acumulación de proteínas mal plegadas, o disminución de la concentración de Ca^{+2} . Estas situaciones generan estrés en el retículo endoplásmico, contra el que las células montan una respuesta llamada UPR (del inglés *Unfolded Protein Response*). Esta respuesta involucra la activación transcripcional de chaperonas como GRP78 (*Glucose Regulated Protein of 78kD*), GRP94 (*Glucose Regulated protein of 94 kDa*), calreticulina y otras moléculas como PDI (*Protein Disulfide Isomerase*). Como parte de esta respuesta, la proteína PERK (*PRKR-like endoplasmic reticulum kinase*) fosforila al factor de inicio de la traducción eIF2 alpha (*Eukaryotic translation initiation factor alpha*), con lo cual se inhibe el inicio de la traducción y la síntesis de proteínas.

La UPR ayuda a que las células puedan contender con las proteínas acumuladas

o mal plegadas, sin embargo cuando el estrés es mayor, las células no pueden recuperarse y mueren por apoptosis [56, 57]. Se ha propuesto que en esta ruta de apoptosis, la caspasa-12 es la iniciadora. Se han postulado tres mecanismos para su activación. El primero propone que la salida de Ca^{+2} del RE hacia el citosol activa a calpaína y ésta activa a la caspasa-12 al procesarla [58]. El segundo mecanismo sugiere que la caspasa-12 se asocia con IRE-1 (*Inositol-Requiring-1*) y TRAF-2 (*TNF receptor-associated factor 2*), formando una plataforma donde la caspasa-12 se autoprocasa y se activa [59]. El tercer mecanismo propone que la caspasa-7, en respuesta a ciertos estímulos, se trasloca al RE y podría activar directamente a la caspasa-12 [60]. Una vez activa la caspasa-12 puede activar a otras caspasas, entre ellas a la pro-caspasa-9 y a la pro-caspasa-7 [61, 62] (Fig. 7).

En humanos, el gen de la procaspasa-12 presenta un codón de paro prematuro y mutaciones que impedirían a la proteína ser funcional [63]. Sin embargo se considera que la procaspasa-4 que presenta una alta homología con la procaspasa-12 y se activa por estrés de RE, es la contraparte humana de la caspasa-12 murina [64]. Se ha descrito que la activación de la caspasa-4 como respuesta a agentes que causan estrés de RE (como taspigargina), depende de Ca^{+2} y calpaína [65]. La sobreexpresión de caspasa-4 causa su autoactivación, así como también la activación de caspasa-3 y de caspasa-9, sin que exista liberación de Cit-C [66].

2.2.1.4 Apoptosis inducida por gránulos citotóxicos.

Los linfocitos T citotóxicos, (CTLs por el inglés *cytotoxic lymphocytes*) son mediadores de muerte celular a través de la ruta extrínseca y las interacciones del Ligando y Receptor de Fas. Pero también tiene poder citotóxico en células infectadas por virus o en células tumorales a través de una ruta que involucra la secreción de perforinas y granzimas. La perforina es una molécula formadora de poros que facilita la liberación de gránulos hacia el citoplasma de las células blanco. Los componentes más importantes de estos gránulos son las Granzimas A y B. La Granzima B corta proteínas en residuos de aspartato y se ha reportado que corta caspasa-10 y algunos sustratos celulares como PARP, lamina B e ICAD. La Granzima B también corta a Bid, y con ello favorece la liberación de Cit-

C activando la ruta apoptótica intrínseca. Además esta Granzima activa directamente a las caspasas-3 y 7.

Por su parte, la Granzima A activa apoptosis independientemente de la actividad de caspasas. La Granzima A, una vez dentro de las células promueve la disminución del potencial de membrana mitocondrial y el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS, por el inglés *reactive oxygen species*). Este incremento provoca la traslocación del complejo SET hacia el núcleo, lo cual podría estar involucrado en la transcripción de genes asociados con respuestas de estrés oxidativo. La Granzima A también procesa proteolíticamente a los tres miembros del complejo SET: la proteína de ensamble nucleosomal SET, HMG2 (por el inglés *high mobility group protein 2*) y Ape 1 (*base excision repair enzyme apurinic/aprimidinic endonuclease 1*). SET normalmente se encuentra inhibiendo la actividad de la DNasa NM23-H1, la proteólisis de SET provoca la liberación de la DNasa resultando en la degradación del DNA. El complejo SET tiene también importantes funciones en la protección de la cromatina y la estructura del DNA, por lo tanto, la inactivación del complejo por la Granzima A podría contribuir a la destrucción de la integridad del DNA y de la cromatina, favoreciendo la apoptosis.

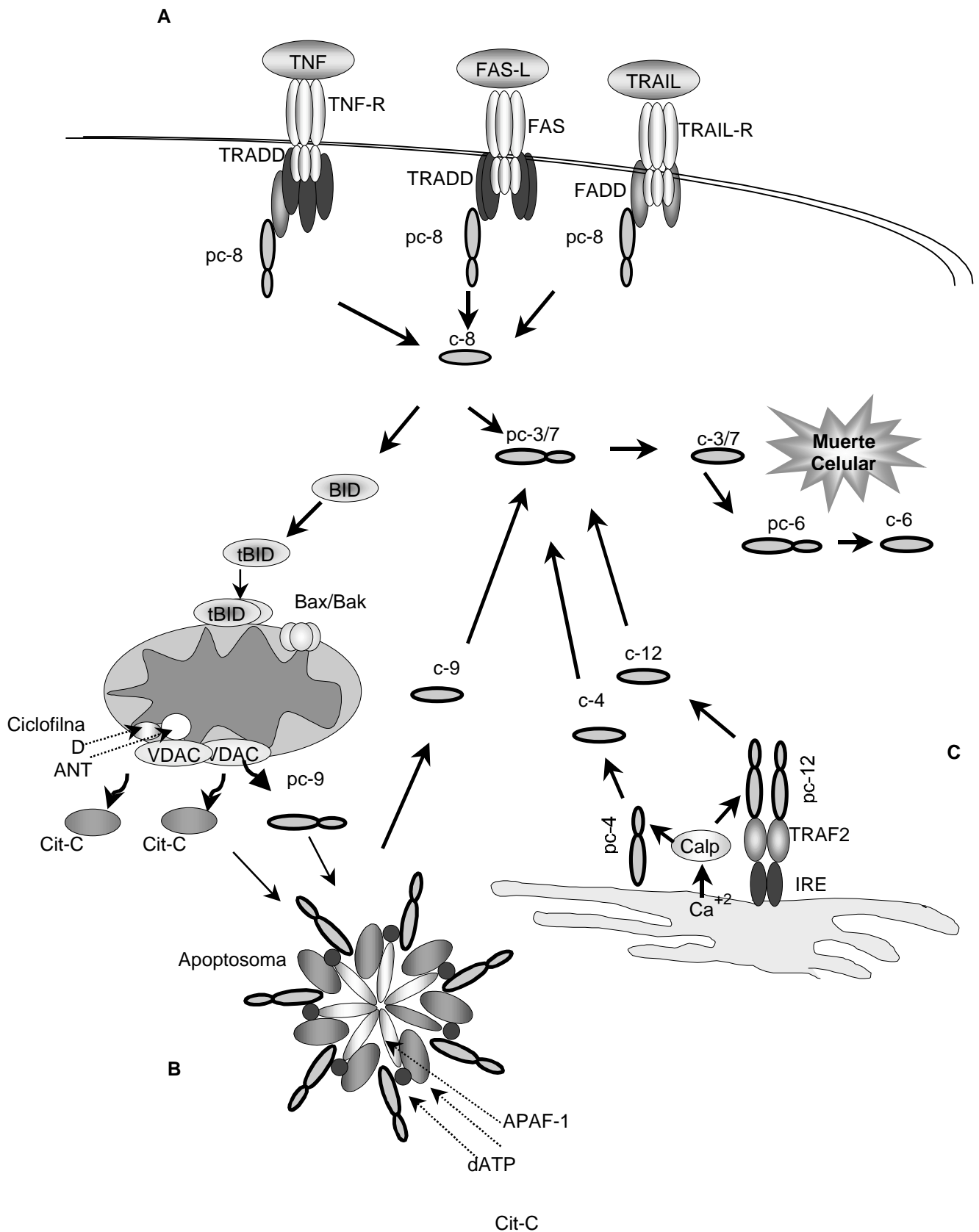


Fig. 7. Rutas de activación de casps A. Ruta extrínseca. B. Ruta intrínseca. C. Activación por Estrés de RE. Las flechas rectas indican activación, las flechas curvas indican salida, y las flechas punteadas indican el nombre de la proteína. c, caspasa; pc, pro-caspasa. calp, calpaína.

3. Apoptosis inducida por AstvH.

En células Caco-2 infectadas con dos serotipos de AstVH se han observado diversos marcadores de apoptosis. Con una cepa de AstVH-8 (Yuc-8), se observó incremento en el número de células TUNEL positivas (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP Nick End Labelling*, indicador de fragmentación del DNA) y cambio del potencial de membrana mitocondrial; así como indicadores de actividad de caspasas como desintegración de lamina A y procesamiento de PARP [3]. En células infectadas con AstVH-4 también se observó incremento en el número de células TUNEL positivas, además de condensación de cromatina; también se detectó la forma activa de caspasa-8 [67]. Aunque estos marcadores sugieren que las caspasas se activan durante la infección, no se ha evaluado directamente la actividad de las mismas. Ni se conoce cual es la caspasa que inicialmente dispara la respuesta apoptótica.

Guix y colaboradores en el 2004, sugirieron que nsp1a del astVH-4, es la responsable de inducir apoptosis, ya que células que expresaron transitoriamente nsp1a, mostraron condensación de cromatina y fragmentación de DNA. Con base en el análisis de la estructura secundaria de la poliproteína nsp1a de varios serotipos de AstVH, encontraron una estructura de seis alfa-hélices que presenta cierta identidad (19%) y similitud (41%) con miembros de la superfamilia de DD (Fig. 4), y que además es similar en estructura al DD de Fas [67]. Por lo anterior, se propuso que este supuesto DD podría ser responsable de la inducción de apoptosis (Fig. 2D). Sin embargo en AstVH-8 no se ha evaluado cuál es la proteína responsable de inducir apoptosis.

Para AstVH-8, la actividad de caspasas parece estar involucrada en el procesamiento de la proteína estructural VP90 para producir VP70, ya que VP70 se hace más abundante en presencia de TRAIL, un inductor de apoptosis y se inhibe con Z-VAD, un inhibidor general de caspasas [3]. La actividad de estas proteasas no afecta la replicación del AstVH-8, ya que los títulos virales en la fracción celular no se modifican en presencia de Z-VAD; pero si disminuyen en la fracción extracelular en el caso de AstVH-8 [3], y en presencia de un inhibidor de caspasa-8 en el caso de AstVH-4 [67]. Si bien las caspasas parecen participar en el corte de VP90 a VP70 y en la salida de virus, no se ha identificado a la caspasa responsable de estos eventos.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la activación de caspasas en células Caco-2 y Hek-293 infectadas con AstVH-8 y el papel que juegan en el ciclo replicativo del virus.

Objetivos particulares

1. Identificar el producto viral que induce la activación de caspasas.
2. Estudiar la cinética de activación de caspasas específicas en células infectadas.
3. Estudiar el procesamiento de VP90 y la salida de astrovirus en función de la actividad de caspasas específicas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La mayoría de los materiales y métodos de este trabajo están descritos en el artículo que conforma el apartado 5.1: *Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism.*

A continuación se describen algunos materiales y métodos adicionales.

Células. Se utilizaron células HEK-293, que se cultivaron básicamente como se describe en la sección material y métodos del apartado 5.1

Sueros y reactivos. Para la identificación de las proteínas virales no estructurales se utilizó el suero anti-1-a3 [21]. Los anticuerpos contra GRP78 (Cat-sc13968) y lamina A/C (Cat-sc-7292) fueron de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo para identificar a p23 (Cat-612320) fue de BD y el anti -caspasa-12 (Cat-AAP-122) de Stressgen.

Transfección de plásmidos para la expresión de proteínas virales. Las proteínas nsp1a, nsp1b y VP90 se clonaron en el vector Hygro (-) cuya expresión está regulada por el promotor de CMV. Las células Caco-2 se transfectaron con Transfast (Promega, Cat: E2431), en presencia de suero fetal bovino, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los tiempos óptimos para la expresión de cada una de las proteínas fueron: nsp1a y nsp1b: 48 h, y VP90: 72 h.

Ensayos de inmunofluorescencia. Las células sembradas en laminillas, transfectadas como se explicó antes, se lavaron 1 vez con Buffer salino de Fosfatos (PBS) y se fijaron con *p*-Formaldehído al 2% durante 15 min a temperatura ambiente (TA), se permeabilizaron con tritón al 0.5% durante 15 minutos a TA, se bloquearon 1 h a TA o toda la noche a 4°C en albúmina sérica Bovina (BSA) al 1% en PBS-NH₄Cl 50 mM, se incubaron con el anticuerpo primario durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, y después con el anticuerpo secundario durante 1 h a TA. Entre cada paso se lavaron abundantemente con PBS-NH₄Cl 50 mM. Finalmente las laminillas se colocaron

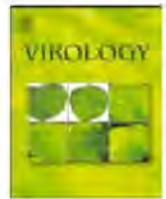
sobre una gota de glicerol al 10% en PBS como medio de montaje y se sellaron. Se analizaron en un microscopio de la marca Zeiss.

Obtención de RNA para análisis de microarreglos de DNA. Las células Caco-2 se cultivaron como se indica en el apartado 5.1. Se infectaron a moi de 10 y a las 2 hpi se extrajo RNA total utilizando Trizol (Invitrogen, Cat. 15596) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El RNA se hizo hibridar en un microarreglo de DNA de 35 574 genes humanos. La hibridación se efectuó en la Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

V. RESULTADOS

La mayor parte de los resultados de este trabajo se publicaron en el artículo *“Papel que juegan diversas caspasaasas activadas por astrovirus, en el procesamiento de su proteína estructural y en su liberación de las células, a través de un mecanismo no lítico”* que se presenta a continuación

5.1 Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism.



Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism

Ma. del Rocío Banos-Lara, Ernesto Méndez*

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 November 2009

Returned to author for revision

13 December 2009

Accepted 23 February 2010

Available online 29 March 2010

Keywords:

Astrovirus

Virus release

Capsid protein processing

Caspases

ABSTRACT

Caspases (*Casp*) activity has been associated with the intracellular proteolytic processing of the structural protein to yield the mature capsid formed by VP70 and with the cell release of human astrovirus (HAstV). This work describes the role of individual *Casp* on these events. The activity of initiator (-8, -9) and executioner (-3/7) *Casp* was clearly detected at 12 h post-infection. All these proteases were able to cleave VP90 in an *in vitro* assay, but this processing was blocked in cells transfected with siRNA against *Casp*-3, -9, but not against *Casp*-8. In contrast, virus release, observed in the absence of cell lysis, was more drastically affected by either silencing *Casp*-3 or in the presence of the inhibitor Ac-DEVD-CHO. Cleavage of VP90 to yield VP70 was mapped at motif TYVD₆₅₇. These data indicate that the processing of VP90 and the release of HAstV from the cell are two *Casp*-related, but apparently independent, events.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Human astroviruses (HAstV) are etiologic agents of viral diarrhea in young children and immunocompromised patients (Gallimore et al., 2005; Mendez and Arias, 2007). Eight genotypes/serotypes of HAstV generally present among human population have been described (Koopmans et al., 1998; Taylor et al., 2001); however, recent reports revealed the presence of astroviruses (AstV), less related to the HAstV serotypes previously described, in children; their clinical relevance is still being investigated (Finkbeiner et al., 2009). AstV have also been identified in a variety of animal species, causing several diseases, besides gastroenteritis (Baxendale and Mebatsion, 2004; Behling-Kelly et al., 2002). Viruses included into the Astroviridae family are non-enveloped icosahedral virus of around 40 nm in diameter, including spikes, and they can be observed as star-like structures in stool samples (Mendez and Arias, 2007). Their genome is formed by a single-stranded RNA molecule of plus polarity that contains three open-reading frames (ORF), named ORF1a, ORF1b, and ORF2. ORF1a and ORF1b code for proteins that contain motifs of a serine-protease and the RNA-dependent RNA polymerase, respectively (Jiang et al., 1993). The non-structural proteins nsp1a and nsp1ab are synthesized from these ORFs and are cleaved by at least one cellular protease and the viral protease (Geigenmuller et al., 2002;

Mendez et al., 2003). On the other hand, ORF2 codes for a protein of 87–90 kDa (named VP90 in HAstV-8) that represents the capsid precursor polypeptide (Mendez et al., 2002; Monroe et al., 1993; Willcocks and Carter, 1993). VP90 contains at least three domains distinguishable by their sequence identity: a highly conserved amino terminal domain (residues 1 to 415), a highly divergent intermediate domain (residues 416 to about 647), and the carboxy-end domain, which is also highly variable (648 to the end) (Jonassen et al., 2001; Mendez-Toss et al., 2000; Wang et al., 2001). In spite of their low identity, the last 130 residues of the protein are highly conserved in the acidic character (Mendez et al., 2004). An intracellular proteolytic processing of particles containing VP90 to yield particles formed by a 70-kDa protein (VP70), which has been related with the maturation of HAstV-8 virions, occurs in this region, and the aspartic acid residues seem necessary for that processing (Mendez et al., 2004). Viral particles containing VP70 are further on extracellularly cleaved by trypsin to generate particles with high infectivity, formed by three proteins of 34, 27, and 25 kDa (named VP34, VP27, and VP25, respectively) (Mendez et al., 2002). The mechanism by which infectivity is enhanced due to trypsin treatment is still unknown.

Apoptosis is one type of programmed cell death, involved in many cellular processes (Doseff, 2004; Hildeman et al., 2007). Particularly, it has been considered as a cell response to viruses infection in order to block their replication (Barber, 2001); however, these pathogens have evolved mechanisms to avoid or modulate that response to successfully complete their replication cycle (McLean et al., 2008). Caspases (*Casp*) are cysteine-proteases specific for aspartic acid residues that play a key role in this kind of cell death. These enzymes can be activated (by proteolysis), by a variety of stimuli, including

* Corresponding author. Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Colonia Miraval, Cuernavaca, Morelos, 62250, México. Fax: +52 777 3291622.

E-mail address: ernesto@ibt.unam.mx (E. Méndez).

ligands to death receptors and cytotoxic drugs (Bertrand et al., 1994; Schulze-Osthoff et al., 1998). At least two different groups of *Casp* involved in cell death have been recognized, depending on how they are activated: initiator (such as *Casp*-8, -9, and -4, among others) and executioner (such as *Casp*-3 and -7, among others). Initiator *Casp* are usually self-activated when cells sense the stimulus by forming protein complexes, whose composition and cell localization depend on the stimuli (MacFarlane, 2003; Riedl and Salvesen, 2007). Two classical pathways involved in the activation of initiator *Casp* are recognized: (a) the extrinsic pathway that frequently results in the activation of *Casp*-8 (or *Casp*-10) is usually initiated by an extracellular signal that recognizes death receptors on the membrane. Ligands, such as tumor necrosis factor (TNF) or TNF-related apoptosis ligand (TRAIL), are examples of extrinsic pathway activators. (b) The intrinsic pathway is frequently initiated by genotoxic stress caused by drugs such as staurosporine and results in the activation of *Casp*-9. This *Casp* forms complexes with mitochondrial factors for its self-activation (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004; Wang et al., 2005). A third route of *Casp* activation triggered by stress in the endoplasmic reticulum (ER) has been recognized (Rao et al., 2001). In this case, *Casp*-4 in human (Hitomi et al., 2004a) and *Casp*-12 in mice cells (Hitomi et al., 2004b; Nakagawa et al., 2000) are the initiator *Casp*, and agents such as thapsigargin or tunicamycin can activate them (Hu et al., 2004). After initiator *Casp* are activated by self-cleavage, these proteases cleave and activate executioner proteases, such as *Casp*-3, -6, and -7 (Inoue et al., 2009). Executioner *Casp* are mostly responsible for the cleavage of cellular proteins with structural or enzymatic activities, taking the cell to dramatic alterations and death (Fischer et al., 2003; Taylor et al., 2008).

Alterations associated with cell death by apoptosis, including cleavage of cellular structural proteins and of the *pro-Casp*-8 (*pCasp*-8) at late times post-infection, have been observed in HAstV-infected Caco-2 cells (Guix et al., 2004a; Mendez et al., 2004). Indirect observations have related *Casp* activity with the release of the virus from the cell (Guix et al., 2004a; Mendez et al., 2004) and with the processing of VP90 to VP70 (Mendez et al., 2004). Both events are enhanced by TRAIL and blocked by the pan-*Casp* inhibitor Z-VAD-fmk (Mendez et al., 2004). Although *Casp*-8 was found cleaved 48 h post-infection (hpi) upon HAstV-4 infection (Guix et al., 2004a), no individual *Casp* has been associated with virus release and VP90 cleavage, since at that time of infection these events had already occurred (Mendez et al., 2004). Cleavage of VP90 seems to be necessary for virus release, but not for viral particles assembly, since infectious particles can be rescued from cells kept in presence of Z-VAD-fmk (Mendez et al., 2007). Thus, the mechanism by which VP90 is cleaved by *Casp* and the specific *Casp* responsible for that cleavage are unknown. This work was carried out to understand better the relationship between the cell response to HAstV infection that results in individual *Casp* activation and the effect of each of these proteases on VP90 cleavage and astrovirus release from the host cell.

Results

Intracellular proteolytic processing of VP90 coincides with the release of astrovirus and the executioner *Casp* activity

The intracellular proteolytic processing of HAstV-8 VP90 to generate VP70, the protein that forms the mature particle, occurs at its carboxy terminus and has been previously related with the release of the virus from the cell (Mendez et al., 2004). To find out whether that correlation indeed exists, a time-course analysis along infection was carried out. Cells were infected and the infectious particles, as well as the viral proteins present in the supernatant and in the cell fraction, were analyzed. Quantification of viral particles yielded a typical one-step growth curve, in which the amount of infectious particles started to increase after 8 h, reaching the highest titer at

12 hpi, which was maintained up to 24 h (Fig. 1A). This increase was in the intracellular as well as in the extracellular particles, although, only about 10% of the total were found extracellular (Fig. 1A). Regarding viral proteins, VP90 started to be detected at 8 hpi, and it was present up to 24 hpi, while its proteolytic product VP70 appeared in the cell fraction at 12 hpi (Fig. 1B). VP70, but not VP90, was clearly observed in the extracellular fraction at 16 hpi (Fig. 1C).

The processing of VP90 to VP70 has been associated with the activity of cellular *Casp* (Mendez et al., 2004), so that to confirm the activity of executioner *Casp*, the cleavage of PARP, considered as classical substrate of these proteases (Germain et al., 1999; Tewari et al., 1995), was followed in this experiment. As observed in Fig. 1D, the 85 kDa *Casp*-dependent cleavage product of PARP appeared at 12 hpi, in coincidence with the cleavage of VP90. The same product was observed in TRAIL-treated uninfected cells, used as control for *Casp* activation (Strater et al., 2002). The *Casp*-dependent cleavage of PARP requires a productive astrovirus infection since its inactivation with psoralen-UV, treatment that reduces drastically its infectivity,

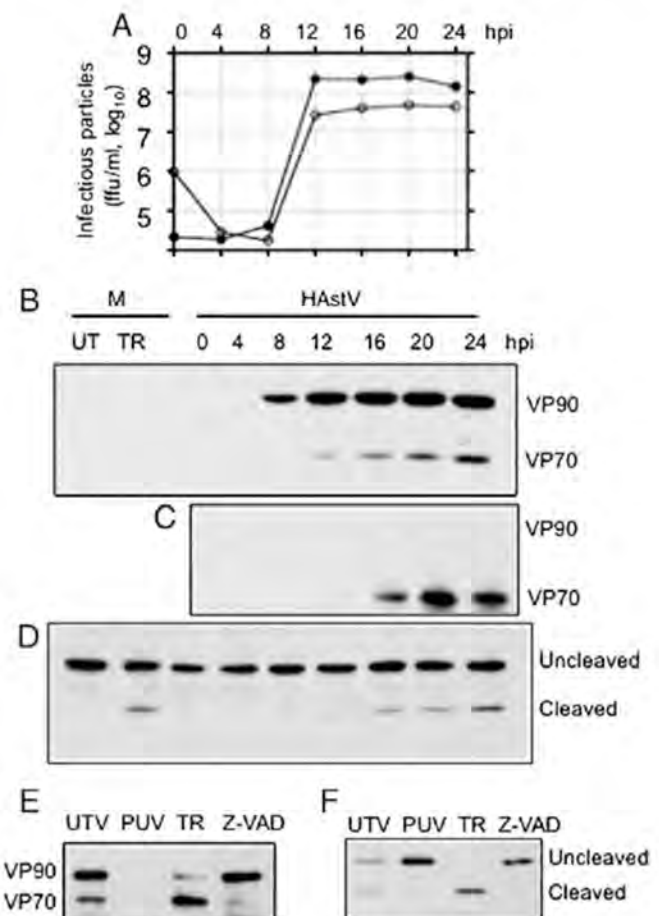


Fig. 1. Processing of the HAstV structural protein VP90 coincides in time with the proteolytic cleavage of PARP, which depends on astrovirus replication. Caco-2 cells were infected with HAstV at moi of 10, and at different time points (from 0 to 24 hpi), the extracellular and cell-associated fractions were analyzed for infectious viral particles and protein content. (A) Particles in the extracellular (empty circles) and in the cell-associated (filled circles) fractions were quantified after trypsin treatment. Cell-associated (B and D) and extracellular (C) proteins were analyzed by Western blot, using anti-HAstV (B and C) and anti-PARP (D) as primary antibodies, as indicated. (E and F) Caco-2 cells were infected with trypsinized virus untreated (UTV) or treated with psoralen-UV (PUV) and the viral proteins (E) and PARP (F) were analyzed at 20 hpi. Proteins from infected cells with untreated virus maintained in the presence TRAIL (TR) and Z-VAD.fmk (Z-VAD) were also analyzed, to confirm caspase-dependent cleavages. M, mock-infected cells; HAstV, astrovirus infected cells; UT, untreated; and TR, TRAIL-treated cells. Results shown are representative of three independent experiments made in duplicates.

although not by affecting the virion structure (Groene and Shaw, 1992) did not induce it, as observed in Fig. 1E and F.

Thus, executioner *Casp* indeed seem to be active upon astrovirus infection and their activity coincides in time with the cleavage of VP90; however, it was unknown whether initiator *Casp* were activated at earlier times of infection.

General *Casp* activation occurs upon HAstV infection

To determine the activation of specific *Casp*, as well as the time at which that occurs, infected cells were analyzed at different time points. *Casp* activity was followed by the cleavage of peptides preferentially recognized by every protease, coupled to aminoluciferin and *p*-nitroaniline. Substrates included DEVD-, LETD-, and LEHD-aminoluciferin, preferential substrates for *Casp-3/7* (García-Calvo et al., 1999), *Casp-8* (Thornberry et al., 2000) and *Casp-9* (Thornberry et al., 1997) and LEVD-*p*-nitroaniline, preferential substrate for *Casp-4* (Talanian et al., 1997), respectively. Cell treatment with TRAIL, staurosporine, and tunicamycin, used as controls (Hitomi et al., 2004a; Stepczynska et al., 2001; Suliman et al., 2001), showed that activation of *Casp-3/7*, -8, -9, and -4, respectively, could be detected by this assay (Fig. 2, panels A to D). Thus, under control conditions, *Casp*'s activity was clearly detected at 6 h and it was maintained high up to 24 h post-treatment. Regarding peptide LEVD-*p*-NA, substrate for *Casp-4*, there was a small but significant cleaving increase at 12 h of tunicamycin treatment, indicating activation of this *Casp*. On the other hand, cleavage of these substrates by HAstV-infected cell extracts was clearly observed at 12 hpi, indicating that *Casp-3/7*, -8, -9, and -4 had been activated at that time. *Casp* activity was maintained up to 24 hpi (Fig. 2A to C), except for the transient activity responsible for cleaving peptide LEVD (Fig. 2D).

Cleavage of *Casp* substrates can be promiscuous since more than one activated *Casp* could cleave the same motif (McStay et al., 2008); therefore, disappearance of the pro-form of every *Casp* (*pCasp*) was later studied to confirm their activation. Pro-forms of *Casp-3*, -7, -8, and -9 were reduced in cells infected with HAstV, as well as after TRAIL treatments, indicating that more than a single *Casp* seemed to be activated upon HAstV infection (Fig. 2E). On the other hand,

cleavage of *pCasp-4* was undetected in HAstV-infected cells or even upon tunicamycin, taspigargin (not shown), and staurosporine treatment, which induced all the rest *pCasp* cleavages, except *Casp-9* (Fig. 2E). Bid was also observed proteolytically processed during infection (Fig. 2E) (see discussion below). These results did not suggest which *Casp* could be involved in the processing of VP90, especially because all of them were active at the same time, when VP90 starts to be processed.

Several *Casp* are involved in the processing of VP90 to yield VP70

To investigate whether the processing of VP90 was due to a specific *Casp*, experiments to individually knock-down initiator (*Casp-4*, -8, and -9) and executioner (*Casp-3*) *Casp* were carried out. The efficiency and specificity of silencing were evaluated by determining the absence of the corresponding *pCasp*. In every case, analysis included comparison with cells that were transfected with an irrelevant siRNA, targeting Luciferase (siRNA-Luc). As shown in Fig. 3, the silencing of a given *Casp* was efficient and specific in the absence of any apoptotic stimulus, since only the silenced *pCasp* was reduced to 2–4%. The only exception was a threefold increase of *pCasp-8*, and a reduction of *Casp-3* after silencing of *Casp-4*; however, this did not correlate with modifications of *Casp-3* activity (Fig. 4E); therefore, these observations were unclear.

To confirm that *pCasp* reduction was not due to a cleavage because their activation, but due to their silencing in HAstV-infected cells, the activated-forms (*Casp**, Fig. 4A and B), or the reduction in the activity (*Casp-4* in Fig. 4C and *Casp-3* in Fig. 4D), were also evaluated. Silencing of initiator *Casp-8* and -9 was efficient in these cells since both *pCasp* and *Casp** were drastically reduced after transfection with the corresponding siRNA (Figs. 3 and 4). Although a small amount of these *pCasp* was still observed in mock-treated cells after transfection with those siRNA, these were not present after infection, indicating that HAstV induced their cleavage, and therefore, a residual protease activity existed in the knocked-down cells. A small reduction of *pCasp-8* and *pCasp-9* was also observed after infection of cells transfected with the control siRNA-Luc, confirming that astrovirus infection indeed induces their activation. The same was observed after treatment

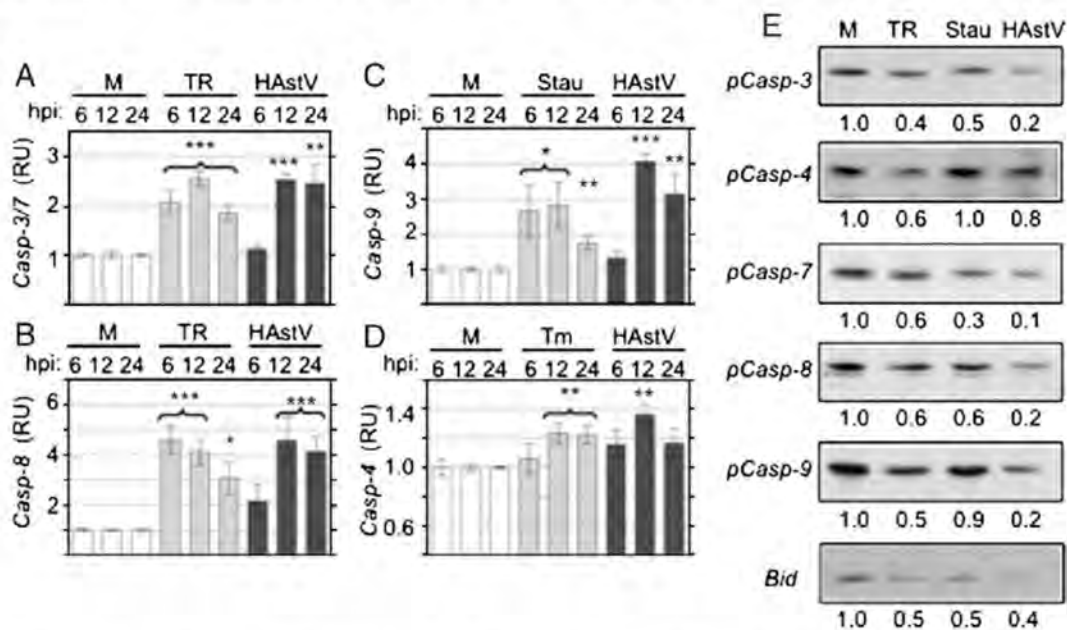


Fig. 2. *Casp* activity in cells infected with HAstV. Caco-2 cells were infected with HAstV (HAstV) at moi of 10, mock-infected (M), or treated with either TRAIL (TR), Staurosporine (Stau) or Tunicamycin (Tm). At the indicated time points (hpi), cells were harvested to determine the activity of individual *Casp* (shown in panels A to D), as well as the respective pro-enzymes and Bid (*pCasp* and Bid, panel E) by immunoblot. Relative units (RU) were calculated based on the activity in mock-treated cells. Graphs represent results of three independent experiments made in duplicates. The statistical significance indicate * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ and *** $P < 0.0001$. Numbers below the blots in panel E represent the relative amount of every *pCasp* detected by densitometry, taking alpha-tubulin, and mock-infected cells as the reference. Representative results of five independent experiments are shown.

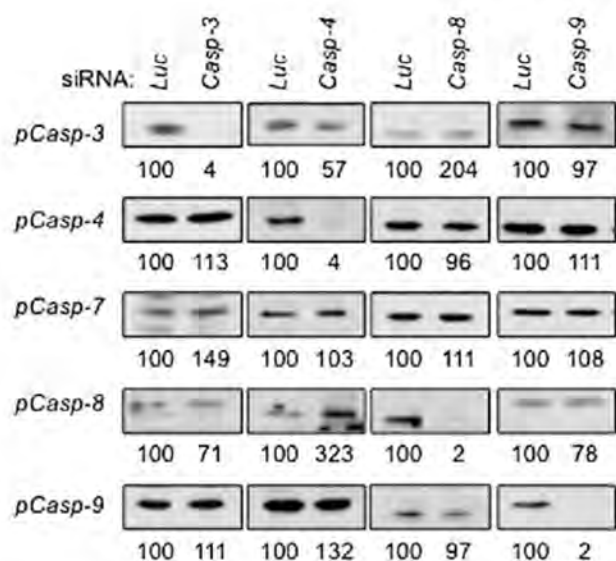


Fig. 3. Silencing of individual *Casp* in siRNA-transfected cells. Caco-2 cells were transfected with the indicated siRNA 3 days before harvesting to detect the indicated *pro-Casp* by immunoblot with specific antibodies. Every gel was also immunoblotted with antibodies to alpha-tubulin, whose signal was used as loading control. Numbers below every well indicate results of the densitometric analysis of the signal obtained by individual anti-*Casp*, based on the signal obtained with anti-tubulin. Results are representative of two to three independent experiments.

with the pro-apoptotic agents TRAIL and staurosporine, respectively, although with this at a minor extent (Fig. 4A and B). *pCasp-4* was also efficiently reduced after transfection with the specific siRNA (siRNA-C4) (Fig. 5C). Although reduction of this pro-enzyme was not obvious after infection or tunicamycin treatment in siRNA-transfected cells, the cleavage of peptide LEVD-*p*-nitroaniline increased slightly, indicating that activation of *Casp-4* occurred in both conditions. Cleavage of LEVD-*p*-nitroaniline was reduced to basal level after transfection with siRNA-C4, indicating that silencing with this siRNA was efficient and that this protease was activated in HAstV-infected cells (Fig. 4C). As shown above, the executioner *pCasp-3* was drastically reduced in control cells transfected with the homologue siRNA-C3, compared with cells transfected with siRNA-Luc, and it was no longer detected in TRAIL-treated and HAstV-infected cells, after silencing (Fig. 4D); its activity was also reduced by silencing (Fig. 4E, see below).

Although *Casp* silencing was specific based on individual *pCasp* cleavages (Fig. 3), given that *Casp* activation occurs in a cascade manner (Kang et al., 1999), it was still possible that blocking expression of a single *Casp* could affect indirectly the activation of downstream executioner *Casp* in HAstV-infected cells. To clear this, *Casp-3/7* activity was evaluated in cells transfected with every single siRNA-C4, siRNA-C8, or siRNA-C9 and then infected with HAstV or treated with the pro-apoptotic agents, as controls. As observed in Fig. 4E, the activity of *Casp-3/7* was reduced in HAstV-infected cells that were previously transfected with individual siRNA targeting *Casp-8* or *-9*, compared with those transfected with the irrelevant siRNA. This observation suggested that these initiator *Casp* could modulate the activity of executioner *Casp* in cells infected with astrovirus. Cells transfected with siRNA-C8 and treated with TRAIL showed a lower activity of *Casp-3/7*, as expected (Fig. 4E). Surprisingly, knocking-down *Casp-9* did not affect the activity of the executioner *Casp-3/7* in staurosporine-treated cells. On the other hand, blocking *Casp-4* expression had no effect on *Casp-3* activity in HAstV-infected or tunicamycin-treated cells (Fig. 4E). As expected, transfection of siRNA-C3 dropped *Casp-3* activity, even in mock-treated cells, confirming a basal *Casp-3* activity in Caco-2 cells (Fig. 4E). These data indicated that initiator *Casp-8* and *-9*, but not *Casp-4*, could

somehow modulate the activity of the executioner *Casp-3* in HAstV-infected cells, through a still undetermined pathway.

Given that several *Casp* were activated and that the carboxy-end of VP90 that is cleaved includes motifs that could be recognized by more than one of these proteases (Mendez et al., 2004), it was unclear which one of them could be actually responsible for that processing. Thus, for a better understanding of the role of these enzymes on VP90 processing, this was evaluated in cells that were knocked-down for every single *Casp*. As shown in Fig. 5, the proteolytic processing of VP90 to VP70 was reduced (between 48% and 62%) in cells knocked-down for *Casp-3*, *-4*, or *-9*, but not in cells knocked-down for *Casp-8* (Fig. 5A). Unexpectedly, *Casp-3/Casp-9* co-silencing block VP90 processing at the same level than individual silencing (Fig. 5A), suggesting that additional *Casp* participated in that cleavage. Reduction in the processing did not directly correlate with the level at which proteases expression was blocked (more than 95%, Fig. 3). This finding could be due to the small fraction of protease synthesized and activated upon silencing was enough to cleave VP90 or due to an indirect effect, in which such small amount of active enzyme was able to cleave and activate the *Casp* actually responsible. Alternatively, more than one *Casp* could be directly involved in the processing of the structural protein. To distinguish among these possibilities, VP90 was *in vitro* translated and treated with purified active proteases, independently (Fig. 5B). Every *Casp* used in this experiment was active since they were able to cleave their respective substrates coupled to aminoluciferine and *p*-NA (not shown) and to cleave *in vitro* translated *Casp-3* dominant negative mutant (DN-C3); as expected, *Casp-3* cleaved DN-C3 at a minor extent (Fig. 5E). Treatment of VP90 with purified *Casp-3*, *-8*, and *-9* yielded a protein of 70 kDa (Fig. 5B) similar in size to VP70 produced in HAstV-infected cells (Fig. 5C); *Casp-4* yielded a small amount of the same VP70 product. The 70-kDa protein was not observed when digestion was carried out in the presence of Z-VAD.fmk, indicating that cleavages were *Casp*-dependent (Fig. 5D). These results indicate that *Casp-3*, *-9*, and *-8*, whose silencing did not block the processing in cells (Fig. 5A), can recognize VP90 as substrate to cleave it, likely at the same site, to yield VP70. Thus, although VP90 can be substrate of *Casp*, only some of them could recognize it and contribute for its cleavage during infection.

To elucidate the cleavage site on VP90 that yield VP70, truncated VP90 mutants that end at DEVD₆₈₆, EETD₆₇₂, EPET₆₅₄, and TY₆₅₃kvr (Fig. 6) were produced and compared with the product obtained by digestion of VP90 with *Casp-3*. These sites were selected to produce the truncated mutants because motifs DEVD₆₈₆, EETD₆₇₂, and TYVD₆₅₇ were predicted as cleaved to yield products of around 70 kDa. As shown in Fig. 6B, proteins VP-DEVD₆₈₆ and VP-EETD₆₇₂ were larger than the product observed after digestion of VP90 with *Casp-3*. On the other hand, given that motifs potentially recognized by *Casp* are not present upstream TYVD₆₅₇ and that proteins VP-EPET₆₅₄ and VP-TY₆₅₃kvr migrated similarly to VP70, the motif TYVD₆₅₇ was the most likely to be cleaved to yield VP70.

Executioner Casp activity may be involved in the release of astrovirus through a non-lytic mechanism

Previous observations suggested that the release of astrovirus was independent of cell death, although directly related with the processing of VP90 (Mendez et al., 2004). Since in this work a general *Casp* activation was observed, it was still possible that cell death would be involved in that step of the replication cycle. To discriminate this possibility, the integrity of infected cells membrane was determined by LDH leakage and by trypan blue staining. Release of LDH was unaffected during HAstV infection, compared to mock-infected cells, even when infection was at high moi and maintained up to 48 hpi (Fig. 7A). This was also observed in cells transfected with every siRNA (Fig. 7B), indicating that this procedure did not affect cell membrane. No differences were found among cells when their viability was quantified by trypan blue staining, where less than 1% of cells infected at high moi

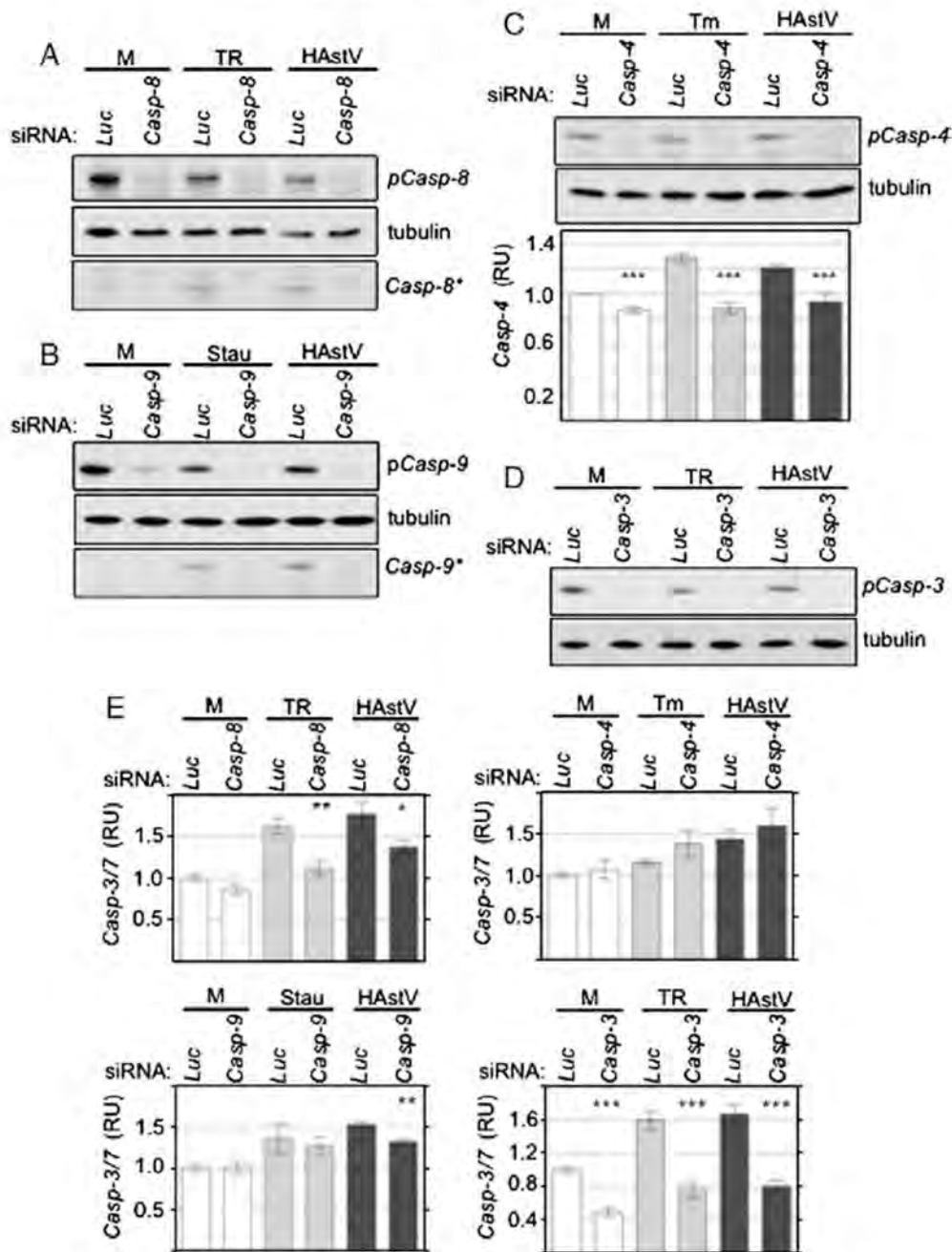


Fig. 4. Silencing of individual *Casp* in HAstV-infected cells and its effect on executioner *Casp* activity. Caco-2 cells were transfected with the indicated siRNA 3 days before either HAstV infection at moi of 10, or treatment with the indicated drug. After 20 hpi, cells were harvested for immunoblot with antibodies to *Casp-8* (panel A), *Casp-9* (panel B), *Casp-4* (panel C), and *Casp-3* (panel D), including the complete (*pCasp*) and, for *Casp-8* and *Casp-9*, the active forms [*Casp**]; anti- α -tubulin was used as loading control. For *Casp-4* (panel C), the activity, instead of the active form, was measured. Cells were also independently harvested at 20 hpi for *Casp-3* activity measurements. Relative units (RU) were calculated similarly to how it was mentioned in Fig. 2. Abbreviations are the same as in Figs. 2 and 3. Average and standard deviation of three independent experiments, made in duplicates, are shown. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$. Average of three independent experiments assayed in duplicate are shown. *** $P < 0.0001$.

was stained (not shown). These data confirmed that cell membrane disruption is not necessary for the virus to be released; however, it was unclear whether it was dependent on VP90 proteolytic processing, as previously suggested (Mendez et al., 2004). To elucidate any relationship between these two events of the replication cycle, virus release was evaluated in cells where VP90 processing was blocked due to *Casp* silencing (Fig. 7A). As observed in Fig. 7C, reduction in virus release was more pronounced after *Casp-3* silencing, to less than 60%; knocking-down *Casp-4* and *Casp-9* had a slight effect, if any; while *Casp-8* silencing had no effect. Contrary to previous suggestions (Mendez et al., 2004), these data showed no correlation between virus release and VP90 processing, but they did with *Casp-3* activity. Thereafter, virus release

was determined by incubating infected cells with *Casp* inhibitors, including Ac-DEVD-CHO, a potent inhibitor for executioner *Casp-3/7*, and Ac-LEHD-CHO and Ac-IETD-CHO, which have been considered inhibitors for *Casp-9* and *Casp-8*, respectively (Fig. 7D). In the presence of Ac-DEVD-CHO, the release of the virus was blocked at similar levels than those observed after infection in the presence of the pan-*Casp* inhibitor Z-VAD.fmk, while inhibitors for the initiator *Casp* had no effect. On the contrary, TRAIL treatment increased the exit of the virus from the cell, as previously reported (Mendez et al., 2004). Thus, executioner *Casp* seems to be the most involved in the release of the virus from the cell through a mechanism that does not involve cell lysis, but other *Casp* could participate in VP90 processing.

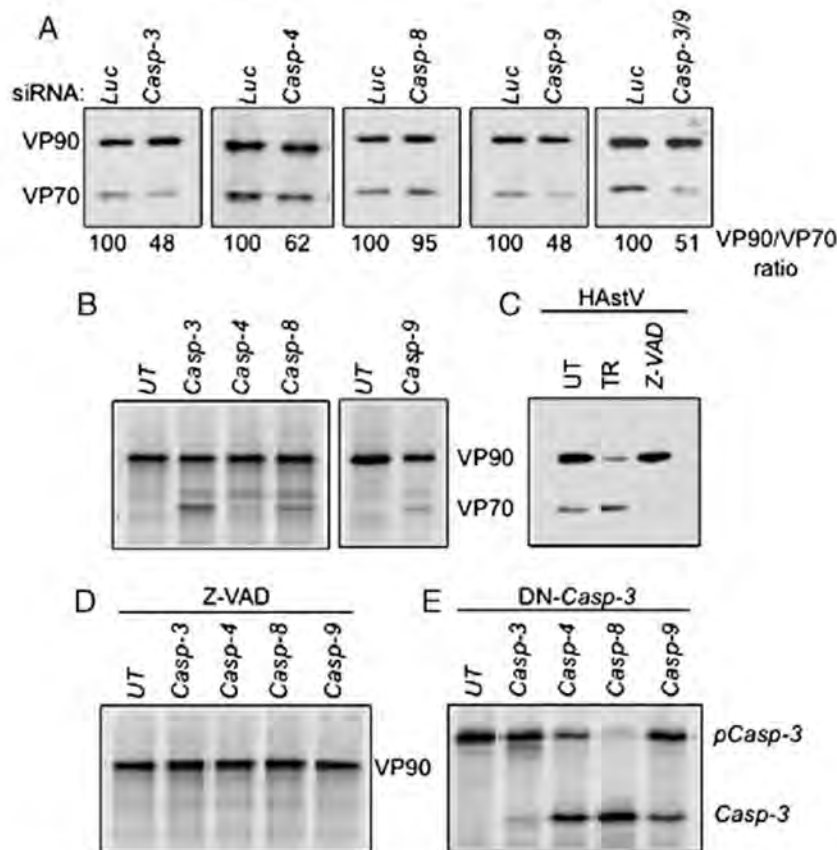


Fig. 5. VP90 is substrate for initiator and executioner *Casp*. In panel A, Caco-2 cells were transfected with the indicated individual siRNA or co-silencing *Casp-3* and *Casp-9* (*Casp-3/9*) and infected with HAstV, as described in Fig. 3. Viral proteins were detected by immunoblot with anti-HAstV, and the ratio VP90/VP70 was calculated based on densitometry. Proteins VP90 (panels B and D) and DN-*Casp-3* (panel E) were *in vitro* translated, in the presence of Express- ^{35}S -Met labeling mix, and either untreated (UT) or digested with the indicated active enzyme. The same reaction mixtures that included VP90 were incubated in the presence of Z-VAD.fmk (panel D) to confirm *Casp*-dependent cleavages. Proteins (panels B, D, and E) were detected by autoradiography after electrophoresis. Proteins of HAstV-infected cells (HAstV, panel C) untreated (UT) or treated either with TRAIL (TR) or Z-VAD.fmk were analyzed by immunoblot with anti-HAstV to compare the proteins obtained by *in vitro* translation. Viral proteins and the products of *Casp*-digestion are indicated.

Discussion

Features indicative of apoptosis have been observed in Caco-2 cells infected with two HAstV strains of different serotypes (Guix et al., 2004a; Méndez et al., 2004). In the case of HAstV-8, *Casp* activity correlated with the processing of the ORF2 primary product, VP90, at its carboxy terminus to generate the protein VP70 that forms the mature extracellular virion. This processing was blocked by the pan-*Casp* inhibitor Z-VAD.fmk (Méndez et al., 2004). Such activity was also associated with the presence of viral particles in the extracellular fraction of infected cells (Méndez et al., 2004), although not with the yield of virus progeny because the pan-*Casp* inhibitor does not block particles formation (Méndez et al., 2004, 2007). To explore the role of individual *Casp* on VP90 processing and virus release, activation of specific *Casp*, as well as these two events, was determined in cells that were knocked-down by siRNA molecules. *Casp-8*, but not *Casp-9*, was suggested as the main initiator *Casp* activated upon astrovirus infection in previous reports (Guix et al., 2004a); however, in this work, cleavage of initiator and executioner *pCasp*, as well as their activity, was detected and continued up to 24 hpi. This observation impeded to suggest the pathway by which *Casp* were initially activated during HAstV infection. As mentioned above, experiments with HAstV-4 suggested that *Casp-8* activate the extrinsic pathway (Guix et al., 2004a). Cleavage of Bid observed in this work (Fig. 3) agrees with this assumption; however, results shown here would indicate that more than one pathway (and stimuli?) would be probably involved in triggering *Casp* activation, since initiator and executioner *Casp* activation coincided in time. In addition, executioner

Casp-3/7 activity was reduced, although not to basal levels, after silencing both initiator *Casp-8* and *Casp-9*, independently. In principle, the cleavage of Bid observed in HAstV-infected cells (Fig. 3) would suggest *Casp-8* as the initiator; however, in *Casp-8*-silenced infected cells, although *Casp-3* activity was reduced, *Casp*-dependent cleavages still occurred, such as VP90 (Fig. 5A) and Bid cleavages (not shown), indicating the activation of *Casp* in a *Casp-8*-independent manner in HAstV-infected cells although it cannot be discarded that other proteases could mediate Bid cleavage in these conditions, as reported (Yin, 2006). On the other hand, the *Casp*-dependent cleavage of VP90 was still observed upon *Casp-3/Casp-9* co-silencing, indicating that a *Casp* activity was present and could be triggered in the absence of either *Casp-8* or *Casp-9*, and therefore, suggesting that more than one pathways may be involved in the activation of *Casp* activity during infection. *Casp* activation seems to be triggered in a post-virus binding/entry step and probably requires virus translation and/or replication, since particles inactivated by psoralen-UV, which seems not to affect the structure of the virus and, therefore, the early steps of infection, as reported for rotavirus (Groene and Shaw, 1992), were not able to induce such activation. Whether nsp1a, as suggested previously (Guix et al., 2004a), or additional factors, triggers *Casp* activation remains to be determined. Limited studies on the cell response to HAstV infection exist, which could give a clue on the mechanism involved in *Casp* activation. Recently, extracellular signal-regulated kinases (ERK-1 and ERK-2) were found active at early stages of astrovirus infection (Moser and Schultz-Cherry, 2008). Given that these molecules may participate in triggering apoptosis by phosphorylating pro-apoptotic factors in some

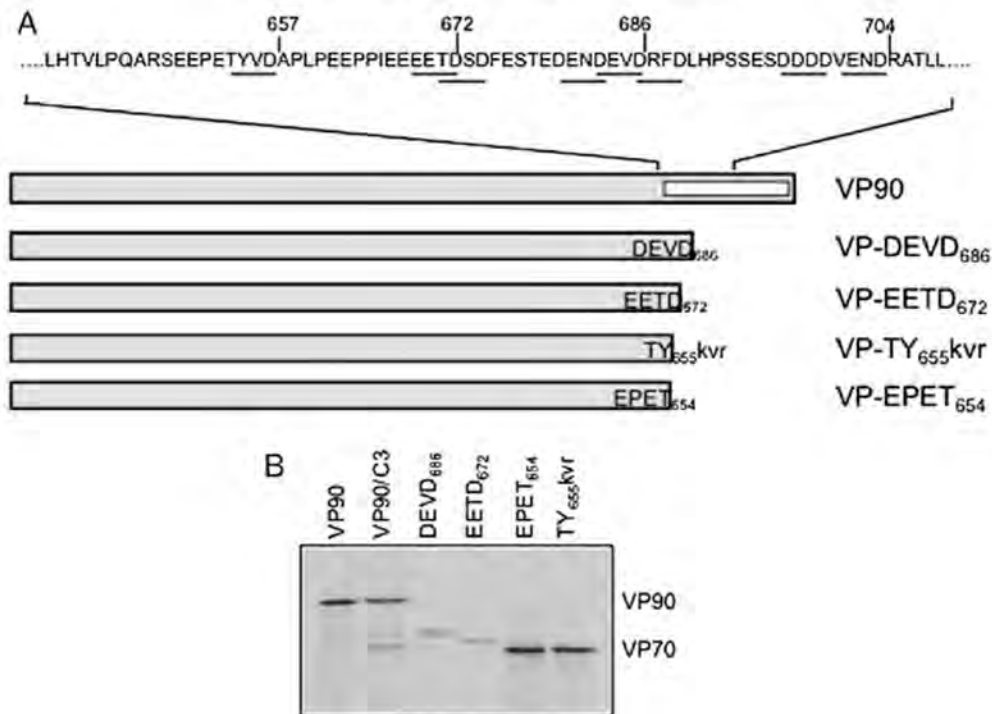


Fig. 6. Processing of VP90 at motif TYVD₆₅₇ yields VP70. (A) Partial sequence, in which *Casp*-recognition motifs are underlined, and scheme of the truncated proteins produced are shown. Proteins are named based on the sequence and the amino acid residue in which they end, as indicated. Minor letters in TY₆₅₅kvr indicate residues included in the construct that are not part of the HAstV-8 structural protein. Numbers above the sequence indicate the amino acid residues, based on HAstV-8 sequence, while the white box, the Asp-rich region in VP90. (B) Proteins were *in vitro* translated and analyzed by autoradiography, as in Fig. 5. Proteins VP90 and VP90 treated with *Casp*-3 (VP90/C3) were used as reference of the viral proteins migration (as indicated).

cells (Mebratu and Tesfaiqi, 2009), they could participate in the activation of *Casp* during HAstV infection; however, this hypothesis requires further investigation.

The processing of VP90 to yield VP70 is blocked by the pan-*Casp* inhibitor Z-VAD.fmk and promoted by TRAIL (Mendez et al., 2004), suggesting a role of *Casp* on this cleavage in HAstV-infected cells. In this work, it was confirmed that indeed *Casp*-3 and -9, but not *Casp*-8, were involved in VP90 processing, since this was partially blocked by individually knocking-down those proteases. However, these proteases in its active form, including *Casp*-8, were able to cleave the protein in an *in vitro* assay, indicating their potential to recognize VP90 as substrate in infected cells. *Casp*-4, on the other hand, seems to contribute to VP90 processing in infected cells, since this was slightly reduced upon silencing; however, its role on this event remains unclear since it barely cleaved *in vitro* translated VP90. Hence, the processing of VP90 observed in infected cells could be carried out in a complex manner, in which more than one *Casp*, either directly or indirectly, could participate. An indirect effect was appreciated in the case of knocking-down *Casp*-9, which affected negatively the activity of *Casp*-3; however, VP90 processing was unaffected by *Casp*-8 silencing that also reduces *Casp*-3 activity. Thus, more than one factor seems to be involved in this event, since silencing of individual *Casp*, independently, or even *Casp*-3/9 co-silencing, both of which participate in that cleavage (Fig. 5), did not block completely the processing of VP90, but it was mostly blocked in the presence of the pan-*Casp* inhibitor Z-VAD.fmk. Additional factors, such as the cellular localization of VP90 and of the proteases and interaction of these proteins with cell factors, could contribute to that processing, as it has been described for other *Casp* substrates (Ramuz et al., 2003). Regarding cell localization, VP90 has been found in at least two different cell compartments, in one of which, when associated with membranes, was protected from proteases digestion, especially at its carboxy-terminus (Mendez et al., 2007), where the *Casp* recognition motifs are located (Mendez et al., 2004, 2007). During infection, VP90 is cleaved at different sites in the carboxy-end region to yield inter-

mediates of 75–82 kDa and the more abundant product of cleavage in the cell, VP70 (Mendez et al., 2004). *In vitro*, the *Casp*-dependent proteolysis of VP90 seems to occur similarly, independently of the *Casp* tested, since the putative carboxy-terminal product of 20 kDa was not observed (data not shown). The structural protein contains an Asp-rich region containing *Casp* recognition motifs that are highly conserved among all astroviruses (Mendez et al., 2004). In the particular case of HAstV-8 VP90, several motifs (underlined in Fig. 6) including VEND₇₀₄, DEVD₆₈₆, EETD₆₇₂, and TYVD₆₅₇ were predicted to be cleaved (analysis made by GraBCas software) (Backes et al., 2005). To determine which one of them could be the cleavage site to yield VP70, truncated mutant proteins were produced and analyzed. Although EETD and DEVD are the most conserved among all astroviruses, motif TYVD₆₅₇, was mapped in HAstV-8, since proteins that end at residues 654 and 655 gave the size than that of VP70. Thus, VEND₇₀₄, EETD₆₇₂, and DEVD₆₈₆ may be cleaved to yield the intermediates of 75–82 kDa observed upon infection (Mendez et al., 2004). It remains to be determined the role that those cleavages have on astrovirus biology.

As with VP90 processing, the release of HAstV from the cell is affected similarly with Z-VAD.fmk and TRAIL (Mendez et al., 2004). Accordingly, in this work, virus exits from the cell coincided with general *Casp* activity at 12 hpi. However, in contrast to that observed for VP90 processing, virus release was differentially affected after silencing individual *Casp*, being most affected after transfection with siRNA against *Casp*-3. The role of *Casp*-3 on virus release was confirmed by infecting Caco-2 in the presence of peptide inhibitors Ac.DEVD-CHO, Ac-LEHD-CHO, and Ac-IETD-CHO. Ac.DEVD-CHO, specific for executioner *Casp*3/7, was the only one able to block the release of astrovirus, at similar extent as the pan-*Casp* inhibitor Z-VAD.fmk did, suggesting that executioner *Casp*-3 (and probably *Casp*-7) is necessary for that event of the replication cycle. In contrast, silencing of *Casp*-9 induces a slight reduction of virus release (approximately 10%), probably through an indirect effect on *Casp*-3 as it has been observed in this work and reported elsewhere (Slee et al., 1999; Yukioka et al., 2008), despite that

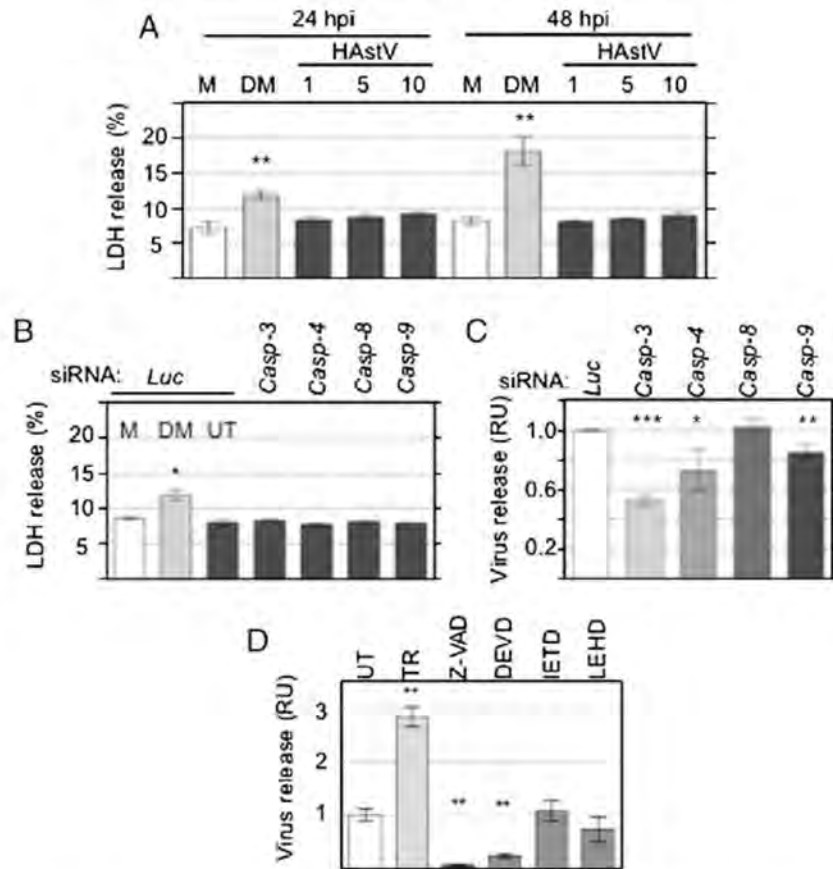


Fig. 7. Executioner *Casp* favors astrovirus release by a non-lytic mechanism. Cells were infected with HAstV at the indicated moi (1 to 10) and harvested at 24 and 48 hpi (including DMSO treatment as positive control), and the release of LDH was calculated as percentage of the total (panel A). Caco-2 cells were transfected with the indicated siRNA and infected with HAstV (panels B and C), as indicated in Fig. 2. Extracellular and intracellular LDH activity (panel B) and infectious particles (panel C) were quantified at 20 hpi and expressed as percentage of the total LDH, and as the ratio of particles found in extracellular/intracellular fractions, compared to that observed in cells transfected with the siRNA-Luc, respectively. Virus release was also measured from cells infected with HAstV at moi of 10 and incubated for 20 h with MEM alone (UT-untreated), or MEM containing TRAIL (TR), Z-VAD.fmk (Z-VAD), or the peptide inhibitors Ac-DEVD-CHO (DEVD), Ac-LEHD-CHO (LEHD) and Ac-IETD-CHO (IETD). M, mock-treated cells; DM, DMSO treatment; UT, untreated cells. Graphs represent the average of at least three independent experiments made in duplicates. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$.

it blocked VP90 processing at the same extent as *Casp-3* silencing. As mentioned above, the role of *Casp-4* on VP90 processing and virus release was unclear since the effect after its silencing, and its activation during infection, although consistent, was weak. Thus, the processing of VP90 and the release of the virus seem to be two *Casp*-related but independent events, so that viral particles containing VP70, once VP90-containing particles have been processed by *Casp-3*, -9, or any other unidentified *Casp*, would be able to exit the cell, but only in the presence of *Casp-3* activity (or other executioner *Casp*, like *Casp-7*). Executioner *Casp* are mainly responsible for the biochemical and morphological changes in apoptosis leading to cell death (Slee et al., 2001); therefore, the release of the virus could be due to an increase of this death. In fact, cellular proteins such as lamin A and PARP and defects in the mitochondrial integrity have been observed upon astrovirus infection (Mendez et al., 2004). However, based on this work and that of others (Moser et al., 2007), HAstV infection does not enhance disruption of cell membrane, as judged by LDH release, up to 36–48 hpi, even in cells infected at high moi. A low percentage of infected cells showed to be TUNEL-positive cells at 24 hpi (Guix et al., 2004a; Mendez et al., 2004), time at which VP90 processing and virus release had occurred, indicating that at this time, most of the cells were viable. Thus, cell viability seems not to be drastically affected in HAstV-infected cells and therefore does not seem to be necessary for virus release. Previous reports indicate that astrovirus release was blocked when HAstV-infected cells were treated with Z-VAD.fmk after being treated with TRAIL, conditions in which VP70 was the structural protein more

abundant (Mendez et al., 2004), and that frequently increases death, either by necrosis or autophagy, in many cell lines (Vandenabeele et al., 2006). Thus, HAstV release seems to require both *Casp* activity and VP90 cleavage, but not cell lysis.

How can astrovirus be released in the absence of cell lysis but with active executioner *Casp*? Cell lysis due to secondary necrosis is observed at late stages of apoptosis, especially when apoptotic cells are not phagocytosed (Silva et al., 2008). At early times, the apoptotic cell is not lysed but its membrane blebs to generate apoptotic bodies, which are usually phagocytosed by other cells. Secondary necrosis does not seem necessary either for astrovirus release since cell lysis was not detected at up to 48 hpi and virus release started at 12 hpi. On the other hand, apoptotic bodies have been suggested as vehicles for chicken anemia virus release (Teodoro and Branton, 1997) because virus particles have been found in these structures. Attempts to detect these structures in Caco-2 cells infected with HAstV have failed so far (data not shown); therefore, it remains to be determined whether this kind of cell structure is important for virus release.

It is important to mention that *Casp* activation does not always result in cell death and secondary necrosis. The extent at what these enzymes are activated (Kuranaga and Miura, 2007) and the cell proteins that interact with them, such as alpha-fetoprotein (AFT) (Li et al., 2009), can modulate cell death progression. In this work, every *Casp* tested was not completely processed to yield the activated form in infected cells, and therefore, their activity did not increase dramatically, even with TRAIL and staurosporine treatments,

independently, suggesting that levels of *Casp* activation and consequently cell death were low in these cells. Previous reports have associated executioner *Casp* activity with intracellular transport of viral proteins. For example, *Casp-3* activity is necessary for the intracellular transport of influenza virus protein NP (Wurzer et al., 2003); in addition, a DEVDase *Casp* activity, encoded by *Spodoptera frugiperda* ascovirus, participates in the release of this virus, favoring the formation of vesicles that contain viral particles, which are necessary for virus dispersion (Bideshi et al., 2005). On the other hand, *Casp-3* activation has correlated with the cleavage of proteins that are necessary for transport among different organelles, such as giantin and syntaxin-5 (Lowe et al., 2004), and proteins involved in endocytosis (Austin et al., 2006). Although the specific role of executioner *Casp* on astrovirus release remains to be determined, it is possible that the executioner *Casp* could participate in, or interfere with, the intracellular traffic of viral particles that contain VP70, but not VP90, in their way to the cell exterior.

Until recently, it was considered that non-enveloped viruses, such as astroviruses, were released from the cell due to cell membrane destabilization. This has been demonstrated with virus such as Coxsackie (van Kuppeveld et al., 1997); however, observations with poliovirus suggest that naked viruses could exit the cell through a non-lytic mechanism, probably involving autophagic vesicles (Jackson et al., 2005). In the case of HAstV, it is unknown whether autophagy is induced during infection, although double membrane vesicles, a hallmark of this process (Deretic and Levine, 2009), containing astrovirus particles have been observed in infected cells (Guix et al., 2004b). Further experiments are necessary to determine whether autophagy is induced during HAstV infection and whether it plays a role on virus release.

Data of this work suggest that the release of the virus is carried out through a non-lytic mechanism that depends, at least, on two related events: the processing of VP90 at the motif TYVD₆₅₇ to generate particles formed by VP70 and the activity of executioner *Casp*.

Materials and methods

Virus and cells

Cells from a human colon adenocarcinoma (Caco-2) obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) were used in this work. Cells were cultivated for 3–4 days in Dulbecco modified essential medium (DMEM) (Sigma Cat. D7777), supplemented with non-essential amino acids (Gibco Cat. 11140) and 10% fetal bovine serum (FBS) (Cansera) at 37 °C and 10% CO₂. Cells were non-differentiated under these conditions. Viral stocks of HAstV (strain Yuc8, passages 28–31) were prepared as previously described (Mendez et al., 2002), using 0.5 as the multiplicity of infection (moi), and activating the virus with trypsin (200 µg/ml, Gibco Cat. 27250-18) for 1 h at 37 °C, and adding soybean trypsin inhibitor (200 µg/ml) just before inoculation to the cells. When virus infectivity would be determined later, the excess of trypsin inhibitor was removed by washing twice the cell monolayer with MEM. Virus infectivity was quantified by immunoperoxidase staining, using anti-HAstV as primary antibodies, as previously described (Mendez et al., 2004). In experiments described below, virus infection was carried out on a confluent cell monolayer at moi of 10 with trypsin-activated virus, and harvested 20h post-infection (hpi), unless otherwise is indicated. Inactivated virus was obtained by psoralen and UV treatment (20 µg/ml and 15 min with UV_{360 nm} light) after trypsin treatment, as previously described (Groene and Shaw, 1992). In general, virus titer diminished 4.5 logs and protein products after trypsin treatment were the same as those obtained from the native virus under these conditions; therefore, it was considered that the structure of the inactivated virus was unaffected by psoralen treatment. In every experiment, mock-

infected cells were treated similarly, including the addition of trypsin and trypsin inhibitor to the inoculum.

Sera and reagents

Rabbit polyclonal serum to HAstV (Yuc8 strain) has been previously described (Mendez et al., 2004; Mendez-Toss et al., 2000). Antibodies to *Casp-8* (Cat. sc-6136), *Casp-9* (Cat. sc-17784), *Casp-4* (Cat. sc-56056), and anti-BID (Cat. sc-11423) were from Santa Cruz Biotechnology; antibodies to *Casp-3* (Cat. 610322), *Casp-7* (Cat. 556541), and to the cleaved form of *Casp-8* (Cat. 556466) were from BD Biosciences Pharmingen, and antibodies to the cleaved form of *Casp-9* were from Calbiochem (Cat. AP1026). Anti-Poly-ADP-ribose polymerase (PARP) (Cat. 9546) and anti-alpha-tubulin (Cat. 18-0092) were purchased to Cell Signalling and Zymed, respectively. TRAIL (Cat. SE-721), used at 4 µg/ml in this work; Z-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (Z-VAD-fmk, Cat. P-416) used at 50 µM, Ac-LEHD-CHO (Cat. P-446) and Ac-IETD-CHO (Cat. P-430) used both at 100 µM, and Ac-DEVD-CHO (Cat. P-414) used at 2 µM, were purchased from BIOMOL. Staurosporine (Cat. S4400) that was used at 2 µM and psoralen (Cat. P8399) were obtained from Sigma, while Tunicamycin was from Boehringer Mannheim (Cat. 724556) and used 100 µg/ml. The active proteases *Casp-3* (Cat. 235417), *Casp-8* (Cat. 218769), *Casp-9* (Cat. 218807), and *Casp-4* (Cat. 218720) were purchased from Calbiochem.

Quantification of *Casp* activity

Activity of *Casp-3/7*, *Casp-8*, and *Casp-9* was determined by measuring the cleavage of their preferential substrates DEVD, LETD and LEHD coupled to aminoluciferin, respectively, using Caspase-Glo reagents (Promega). Based on the manufacturer recommendations, mock- or infected-cells were lysed with the corresponding reagent (either Caspase-Glo-3/7, -8, and -9), and the luminescence was measured after 30 min in the Monolight 2010 apparatus (Analytical Luminescence Laboratory). On the other hand, *Casp-4* activity was determined by colorimetry, using its preferential substrate LEVD-p-nitroaniline (LEVD-pNA), according to the manufacturer instructions (Biovision Cat. 1110-200). Approximately 10⁶ cells were recovered and lysed with buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 0.1% Chaps, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, and 0.1% Triton x-100), incubating 10 min on ice; centrifuged for 1 min at 10,000×g, and the supernatant was 2-fold diluted with 2× *Casp* Reaction (CR) buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM sodium chloride, 0.1% Chaps, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glycerol) (Stennicke and Salvesen, 1997). Every reaction was carried out with equivalent protein concentration by adding 5 µl of substrate LEVD-pNA and incubating 2 h at 37 °C. Optical density was measured at 405 nm. For these experiments, cells were treated with TRAIL, staurosporine or tunicamycin, as controls.

In vitro translation of VP90 and cleavage by active *Casp*

The plasmid that expresses HAstV-8 VP90 has been previously described (Mendez et al., 2007). This construct was used to obtain VP90 truncated mutants that end at motifs DEVD₆₈₆, EETD₆₇₂, EPET₆₅₄, and TY₆₅₅kvr, named VP-DEVD₆₈₆, VP-EETD₆₇₂, VP-EPET₆₅₄, and VP-TY₆₅₅kvr, respectively. Protein VP-TY₆₅₅kvr includes 3 amino acid residues (KVR) at the carboxy-end, which are not present in the structural astrovirus protein. Plasmid expressing the dominant negative mutant of *Casp-3* (DN-*Casp-3*) was kindly provided by D. E. Bredesen (Buck Institute for Research in Aging, CA). Expression of these proteins was controlled by the phage T7 RNA polymerase promoter. Linearized plasmids were mixed with a Master Mix of T_{NT}-T7 (Promega) and 10 µCi of Express-³⁵S-Met labeling mix (New England Nuclear) and incubated 1 h at 30 °C. One fraction of this reaction mixture was added independently to 3 µl of active forms of *Casp-3*, *Casp-4*, *Casp-8*, or *Casp-9* and diluted up to 25 µl with CR buffer. After

Table 1
Features of siRNA molecules.

Gene	Sequence	Nucleotide	Accession	Work Concentration	Reference
Casp-8	GAUACUGUC UGAUCAUCAATdT	796-814	NM_033356	64 µM	This work
Casp-9	GCUUCGUUUCUGCGAACUAdTdT	351-369	NM_032996	32 µM	This work
Casp-3	CACAGCACCUGGUUUAUUAdTdT	690-708	NM_032991	3.2 µM	This work
Casp-4	GGACUUAUGUGUAGAUGUA GAGACUAUGUAAAGAAAGA GAGGAAUCUGCGAACUG UAGAGGAAGUUAUUCGGAA	580-599 418-437 713-732 1089-1108	NM_001225	1.6 µM	This work
Luciferase	GUGCGUUGCUAGUACCAcTdT	851-871	AB261988.1	1.6, 3.2, 6.4 µM	Montero et al. (2008)

incubation at 37 °C for 5 h, Laemmli sample loading buffer was added and the protein products were separated by SDS-PAGE and analyzed by autoradiography.

Immunoblot

Cell monolayer was washed twice with MEM at the indicated time post-infection and harvested in Laemmli Sample loading buffer, supplemented with Complete proteases inhibitor cocktail (Roche, Cat. 11697). Proteins were electrophoresed in SDS-Polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Millipore Cat. HATF00010), which were blocked with 5% non-fat dried milk in Tris-buffered saline solution plus 0.1% Tween-20 (TBS-T). Primary and secondary antibodies were diluted in the same buffer and incubated either 1 h at room temperature (when anti-HAStV, anti-tubulin, and anti-PARP are used) or overnight at 4 °C (with anti-Casp and anti-Bid). Membranes were washed, and the proteins were visualized by chemiluminescence (Luminol reagent, Perkin Elmer Cat. NEL104).

Transfection of Caco-2 cells with siRNA

For every siRNA, the optimal concentration that resulted in the lowest target protein expression and highest transfection efficiency (in every experiment, higher than 95%) was determined experimentally (Table 1). Caco-2 cells were transfected using the Nucleofector device and solution T, based on the manufacturer recommendations (Amaxa Cat. VCA-1002). Cells were infected, or treated as indicated in the corresponding section, after 3 days of transfection.

Lactate dehydrogenase leakage assays

It was carried out with the *in vitro* Toxicology Assay kit (Sigma Cat. TOX-7). Briefly, media from the cell culture was removed and stored at 4 °C, while the cell monolayer was lysed with the buffer included in the kit (previously diluted 1:10 with MEM), incubating at 37 °C for 45 min. After lysis of the cell fraction, the supernatant initially recovered and one-tenth of the cell fraction were independently mixed with the assay mixture and kept 30 min at room temperature. LDH activity was determined based on the optical density and expressed as percentage of the total activity.

Statistics

Statistical analysis for every experiment was determined by a two-tailed *T*-test with confidence interval of 99%, using the GraphPad Prism 4.0 Software (GraphPad Software, Inc.).

Acknowledgments

We thank G. Aguirre-Crespo for excellent technical assistance. We also thank D. E. Bredesen for the DN-C3 plasmid. This work was partially supported by grants 44884-Q and 79574 from CONACyT, and grants IN226106 and CRP.LA/MEX03-01 from DGAPA-UNAM and

ICGB-OPS-RELAB, respectively. M.R.B.L. was supported by a scholarship from CONACyT.

References

- Austin, C.D., Lawrence, D.A., Peden, A.A., Varfolomeev, E.E., Torpal, K., De Maziere, A.M., Klumperman, J., Arnott, D., Pham, V., Scheller, R.H., Ashkenazi, A., 2006. Death-receptor activation halts clathrin-dependent endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (27), 10283–10288.
- Backes, C., Kuentzer, J., Lenhof, H.P., Comtesse, N., Meese, E., 2005. GrabCas: a bioinformatics tool for score-based prediction of caspase- and granzyme B-cleavage sites in protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 33 (Web Server issue), W208–W213.
- Barber, G.N., 2001. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ.* 8 (2), 113–126.
- Baxendale, W., Mebatsion, T., 2004. The isolation and characterisation of astroviruses from chickens. *Avian Pathol.* 33 (3), 364–370.
- Behling-Kelly, E., Schultz-Cherry, S., Koci, M., Kelley, L., Larsen, D., Brown, C., 2002. Localization of astrovirus in experimentally infected turkeys as determined by *in situ* hybridization. *Vet. Pathol.* 39 (5), 595–598.
- Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K.W., Pommier, Y., 1994. Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp. Cell Res.* 211 (2), 314–321.
- Bideshi, D.K., Tan, Y., Bigot, Y., Federici, B.A., 2005. A viral caspase contributes to modified apoptosis for virus transmission. *Genes Dev.* 19 (12), 1416–1421.
- Deretic, V., Levine, B., 2009. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 5 (6), 527–549.
- Doseff, A.I., 2004. Apoptosis: the sculptor of development. *Stem Cells Dev.* 13 (5), 473–483.
- Finkbeiner, S.R., Le, B.M., Holtz, L.R., Storch, G.A., Wang, D., 2009. Detection of newly described astrovirus MLB1 in stool samples from children. *Emerg. Infect. Dis.* 15 (3), 441–444.
- Fischer, U., Janicke, R.U., Schulze-Osthoff, K., 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 10 (1), 76–100.
- Fuentes-Prior, P., Salvesen, G.S., 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* 384 (Pt 2), 201–232.
- Gallimore, C.I., Taylor, C., Gennery, A.R., Cant, A.J., Galloway, A., Lewis, D., Gray, J.J., 2005. Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J. Clin. Microbiol.* 43 (8), 3890–3894.
- García-Calvo, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Zamboni, R., Nicholson, D.W., Thornberry, N.A., 1999. Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differ.* 6 (4), 362–369.
- Geigenmüller, U., Chew, T., Gintion, N., Matsui, S.M., 2002. Processing of nonstructural protein 1a of human astrovirus. *J. Virol.* 76 (4), 2003–2008.
- Germain, M., Affar, E.B., D'Amours, D., Dixit, V.M., Salvesen, G.S., Poirier, G.G., 1999. Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J. Biol. Chem.* 274 (40), 28379–28384.
- Groene, W.S., Shaw, R.D., 1992. Psoralen preparation of antigenically intact noninfectious rotavirus particles. *J. Virol. Methods* 38 (1), 93–102.
- Guix, S., Bosch, A., Ribes, E., Dora Martínez, L., Pinto, R.M., 2004a. Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells. *Virology* 319 (2), 249–261.
- Guix, S., Caballero, S., Bosch, A., Pinto, R.M., 2004b. C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA. *J. Virol.* 78 (24), 13627–13636.
- Hildeman, D., Jorgensen, T., Kappler, J., Marrack, P., 2007. Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 19 (5), 516–521.
- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., Tohyama, M., 2004a. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J. Cell Biol.* 165 (3), 347–356.
- Hitomi, J., Katayama, T., Taniguchi, M., Honda, A., Imaizumi, K., Tohyama, M., 2004b. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neurosci. Lett.* 357 (2), 127–130.
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A.D., Exton, J.H., 2004. Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 279 (47), 49420–49429.
- Inoue, S., Browne, G., Melino, G., Cohen, G.M., 2009. Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death Differ.* 16 (7), 1053–1061.

- Jackson, W.T., Giddings Jr., T.H., Taylor, M.P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R.R., Kirkegaard, K., 2005. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 3 (5), e156.
- Jiang, B., Monroe, S.S., Koonin, E.V., Stine, S.E., Glass, R.I., 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (22), 10539–10543.
- Jonassen, C.M., Jonassen, T.O., Saif, Y.M., Snodgrass, D.R., Ushijima, H., Shimizu, M., Grinde, B., 2001. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J. Gen. Virol.* 82 (Pt 5), 1061–1067.
- Kang, J.J., Schaber, M.D., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Litwack, G., Hall, D.J., Bjornsti, M.A., 1999. Cascades of mammalian caspase activation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274 (5), 3189–3198.
- Koopmans, M.P., Bijen, M.H., Monroe, S.S., Vinje, J., 1998. Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5 (1), 33–37.
- Kuranaga, E., Miura, M., 2007. Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination. *Trends Cell Biol.* 17 (3), 135–144.
- Li, M., Li, H., Li, C., Zhou, S., Guo, L., Liu, H., Jiang, W., Liu, X., Li, P., McNutt, M.A., Li, G., 2009. Alpha fetoprotein is a novel protein-binding partner for caspase-3 and blocks the apoptotic signaling pathway in human hepatoma cells. *Int. J. Cancer* 124 (12), 2845–2854.
- Lowe, M., Lane, J.D., Woodman, P.G., Allan, V.J., 2004. Caspase-mediated cleavage of syntaxin 5 and giantin accompanies inhibition of secretory traffic during apoptosis. *J. Cell Sci.* 117 (Pt 7), 1139–1150.
- MacFarlane, M., 2003. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol. Lett.* 139 (2–3), 89–97.
- McLean, J.E., Ruck, A., Shirazian, A., Pooyael-Mehr, F., Zakeri, Z.F., 2008. Viral manipulation of cell death. *Curr. Pharm. Des.* 14 (3), 198–220.
- McStay, G.P., Salvesen, G.S., Green, D.R., 2008. Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ.* 15 (2), 322–331.
- Mebratu, Y., Tesfaiagi, Y., 2009. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8 (8), 1168–1175.
- Mendez, E., Arias, C.F., 2007. Astrovirus. In: Fields, D.N.K.B.N., Howley, P.M. (Eds.), *Virology*. Raven Press, New York, pp. 982–1000 (Vol. vol. 1, 2 vols).
- Mendez, E., Fernandez-Luna, T., Lopez, S., Mendez-Toss, M., Arias, C.F., 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J. Virol.* 76 (16), 7996–8002.
- Mendez, E., Salas-Ocampo, M.P., Munguia, M.E., Arias, C.F., 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *J. Virol.* 77 (21), 11378–11384.
- Mendez, E., Salas-Ocampo, E., Arias, C.F., 2004. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J. Virol.* 78 (16), 8601–8608.
- Mendez, E., Aguirre-Crespo, G., Zavala, G., Arias, C.F., 2007. Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. *J. Virol.* 81 (19), 10649–10658.
- Mendez-Toss, M., Romero-Guido, P., Munguia, M.E., Mendez, E., Arias, C.F., 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *J. Gen. Virol.* 81 (Pt 12), 2891–2897.
- Monroe, S.S., Jiang, B., Stine, S.E., Koopmans, M., Glass, R.I., 1993. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *J. Virol.* 67 (6), 3611–3614.
- Montero, H., Rojas, M., Arias, C.F., Lopez, S., 2008. Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* 82 (3), 1496–504.
- Moser, L.A., Schultz-Cherry, S., 2008. Suppression of astrovirus replication by an ERK1/2 inhibitor. *J. Virol.* 82 (15), 7475–7482.
- Moser, L.A., Carter, M., Schultz-Cherry, S., 2007. Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication. *J. Virol.* 81 (21), 11937–11945.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., Yuan, J., 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403 (6765), 98–103.
- Ramuz, O., Isnardon, D., Devillard, E., Charafe-Jauffret, E., Hassoun, J., Birg, F., Xerri, L., 2003. Constitutive nuclear localization and initial cytoplasmic apoptotic activation of endogenous caspase-3 evidenced by confocal microscopy. *Int. J. Exp. Pathol.* 84 (2), 75–81.
- Rao, R.V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Bredesen, D.E., 2001. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J. Biol. Chem.* 276 (36), 33869–33874.
- Riedl, S.J., Salvesen, G.S., 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (5), 405–413.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M.E., 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254 (3), 439–459.
- Silva, M.T., do Vale, A., dos Santos, N.M., 2008. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis* 13 (4), 463–482.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., Martin, S.J., 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* 144 (2), 281–292.
- Slee, E.A., Adrain, C., Martin, S.J., 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276 (10), 7320–7326.
- Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., 1997. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J. Biol. Chem.* 272 (41), 25719–25723.
- Stepczynska, A., Lauber, K., Engels, I.H., Janssen, O., Kabelitz, D., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., 2001. Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene* 20 (10), 1193–1202.
- Strater, J., Walczak, H., Pukrop, T., Von Muller, L., Hasel, C., Kornmann, M., Mertens, T., Moller, P., 2002. TRAIL and its receptors in the colonic epithelium: a putative role in the defense of viral infections. *Gastroenterology* 122 (3), 659–666.
- Suliman, A., Lam, A., Datta, R., Srivastava, R.K., 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* 20 (17), 2122–2133.
- Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D., Wong, W.W., 1997. Substrate specificities of caspase family proteases. *J. Biol. Chem.* 272 (15), 9677–9682.
- Taylor, M.B., Walter, J., Berke, T., Cubitt, W.D., Mitchell, D.K., Matson, D.O., 2001. Characterisation of a South African human astrovirus as type 8 by antigenic and genetic analyses. *J. Med. Virol.* 64 (3), 256–261.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (3), 231–241.
- Teodoro, J.G., Branton, P.E., 1997. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J. Virol.* 71 (3), 1739–1746.
- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M., 1995. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81 (5), 801–809.
- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., Nicholson, D.W., 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272 (29), 17907–17911.
- Thornberry, N.A., Chapman, K.T., Nicholson, D.W., 2000. Determination of caspase specificities using a peptide combinatorial library. *Methods Enzymol.* 322, 100–110.
- van Kuppeveld, F.J., Hoenderop, J.G., Smeets, R.L., Willems, P.H., Dijkman, H.B., Galama, J.M., Melchers, W.J., 1997. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *Embo J.* 16 (12), 3519–3532.
- Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T., Festjens, N., 2006. Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci. STKE* 2006 (358), pe44.
- Wang, Q.H., Kakizawa, J., Wen, L.Y., Shimizu, M., Nishio, O., Fang, Z.Y., Ushijima, H., 2001. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. *J. Med. Virol.* 64 (3), 245–255.
- Wang, Z.B., Liu, Y.Q., Cui, Y.F., 2005. Pathways to caspase activation. *Cell Biol. Int.* 29 (7), 489–496.
- Willcocks, M.M., Carter, M.J., 1993. Identification and sequence determination of the capsid protein gene of human astrovirus serotype 1. *FEMS Microbiol. Lett.* 114 (1), 1–7.
- Wurzer, W.J., Planz, O., Ehrhardt, C., Giner, M., Silberzahn, T., Pleschka, S., Ludwig, S., 2003. Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J.* 22 (11), 2717–2728.
- Yin, X.M., 2006. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 369, 7–19.
- Yukioka, F., Matsuzaki, S., Kawamoto, K., Koyama, Y., Hitomi, J., Katayama, T., Tohyama, M., 2008. Presenilin-1 mutation activates the signaling pathway of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Neurochem. Int.* 52 (4–5), 683–687.

5.2. Resultados adicionales de actividad de caspasas en células Caco-2.

5.2.1 Identificación de la proteína viral responsable de la inducción de apoptosis.

Para determinar qué proteína de AstVH-8 induce apoptosis, se transfectaron plásmidos que contienen genes que codifican para cada una de las poliproteínas virales nsp1a, nsp1b y VP90 en células Caco-2 y se procesaron para ensayos de inmunofluorescencia como se indica en la sección material y métodos. Se contaron las células que expresaron las proteínas virales y que fueron positivas a dos marcadores de apoptosis: condensación de la cromatina y desintegración de lamina A/C. Los marcadores indican que la célula está en la fase terminal de apoptosis y la actividad de caspasas sobre sustratos celulares, respectivamente. Los resultados de la Fig. 8 muestran que la poliproteína que mayoritariamente promueve estos eventos es nsp1a.

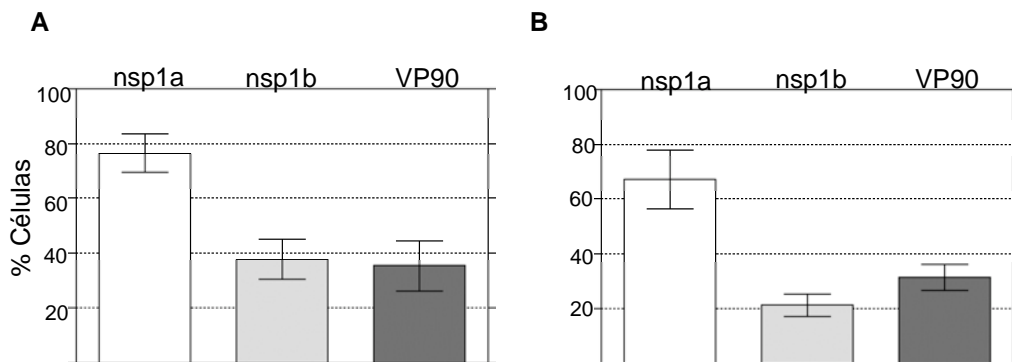


Fig. 8. Marcadores de apoptosis en células que expresan las poliproteínas virales. Cada una de las proteínas se expresaron transitoriamente en células Caco-2, y se prepararon para ensayos de inmunofluorescencia como se describe en material y métodos. La gráfica expresa el porcentaje de células que mostraron cromatina condensada (A) y lamina A/C degradada (B) del total de células que expresaron las proteínas que se indican arriba de cada barra.

5.2.2 La infección induce actividad de caspasas-2 y -6.

Como se describe en el apartado 5.1, la interferencia de las caspasas-3, -9 y en menor efecto de la caspasa-4 inhiben parcialmente el procesamiento de VP90, pero la total inhibición del procesamiento se obtiene cuando un inhibidor general de caspasas está presente en la infección (Mendez et al., 2004), lo que sugiere que en la infección podrían activarse otras caspasas. Para determinar si otras caspasas se activan, se evaluó la actividad de la caspasa iniciadora -2 [68] y de la efectora -6 [69] utilizando los reactivos acoplados a sustratos luminiscentes adecuados. Como control positivo, las células se trataron con TRAIL [70]. En la Fig. 9 se muestra que la caspasa-6 parece activarse desde las 6 hpi y la caspasa-2 al rededor de las 12 hpi.

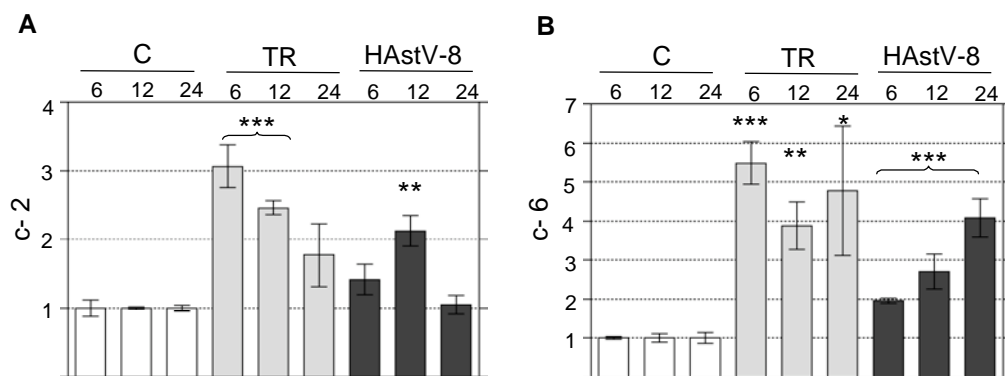


Fig. 9. Actividad de casp-2 y -6 en la infección con HAstV-8. Las células Caco-2 se infectaron a moi de 10 o se trataron con TRAIL (4 ug/ml) y a las 6,12 y 24 hpi o tratamiento, se cosecharon para determinar la actividad de casp-2 (A) y casp-6 (B). Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes realizados por duplicado y las diferencias significativas *P<0.01, **P<0.001, ***P<0.0001.

5.2.3 Actividad de caspasas en la infección en presencia de apoptogénicos.

Se ha observado que células infectadas en presencia de TRAIL muestran un mayor procesamiento de sustratos de caspasas que las que sólo son infectadas o sólo tratadas con el ligando [3]. Para averiguar si esta respuesta era específica de TRAIL, o también ocurría con otros apoptogénicos, se evaluó la actividad de caspasas en presencia de agentes que indujeran apoptosis por la ruta intrínseca (estaurosporina) y por estrés de RE (tapsigargina). Las células se infectaron a *moi* de 10 y a las 14 hpi se añadieron los apoptogénicos. Tras 20 hpi (6 h de tratamiento) las células se cosecharon para analizarlas por *western blot* (wb).

En células tratadas solo con TRAIL o sólo con estaurosporina, se observó la disminución de todas las procaspasas evaluadas (en menor grado la caspasa-12), la forma procesada de PARP (Fig. 10A) y en el caso de TRAIL la actividad de caspasa-3/7 (Fig. 10B); En contraste, en células tratadas con tapsigargina, se encontró una ligera reducción de las pro-caspasas. Este tratamiento promovió el incremento de GRP78, una chaperona cuya expresión se eleva en apoptosis inducida por estrés de RE [71].

En las células infectadas se observa la disminución de todas las procaspasas y la forma procesada de PARP (Fig. 10A). De manera general, en las células infectadas en presencia de los apoptogénicos las procaspasas resultaron menos abundantes y el corte de PARP fue más evidente, sin embargo el efecto fue mayor en la infección en presencia de TRAIL; además en esta condición, la actividad de caspasa-3/7 también fue mayor que en células sólo infectadas o sólo tratadas con TRAIL (Fig. 10B). Así mismo, se detectaron las formas activas de caspasa-3 y la forma procesada de p23, una chaperona que regula la actividad de HSP70 y que es procesada en condiciones de estrés de RE [72] (Fig. 10A). Los resultados sugieren que la infección podría potenciar la respuesta de actividad de caspasas al tratamiento con TRAIL.

Por otra parte, células infectadas en presencia de tapsigargina no muestran la sobreexpresión de GRP78 que se aprecia en células sólo tratadas con tapsigargina (Fig. 10A) o con tunicamicina (no mostrado). Ya que la sobreexpresión de GRP78 es un indicador de estrés de RE, el resultado podría ser un indicio de que el virus modula el estrés de RE.

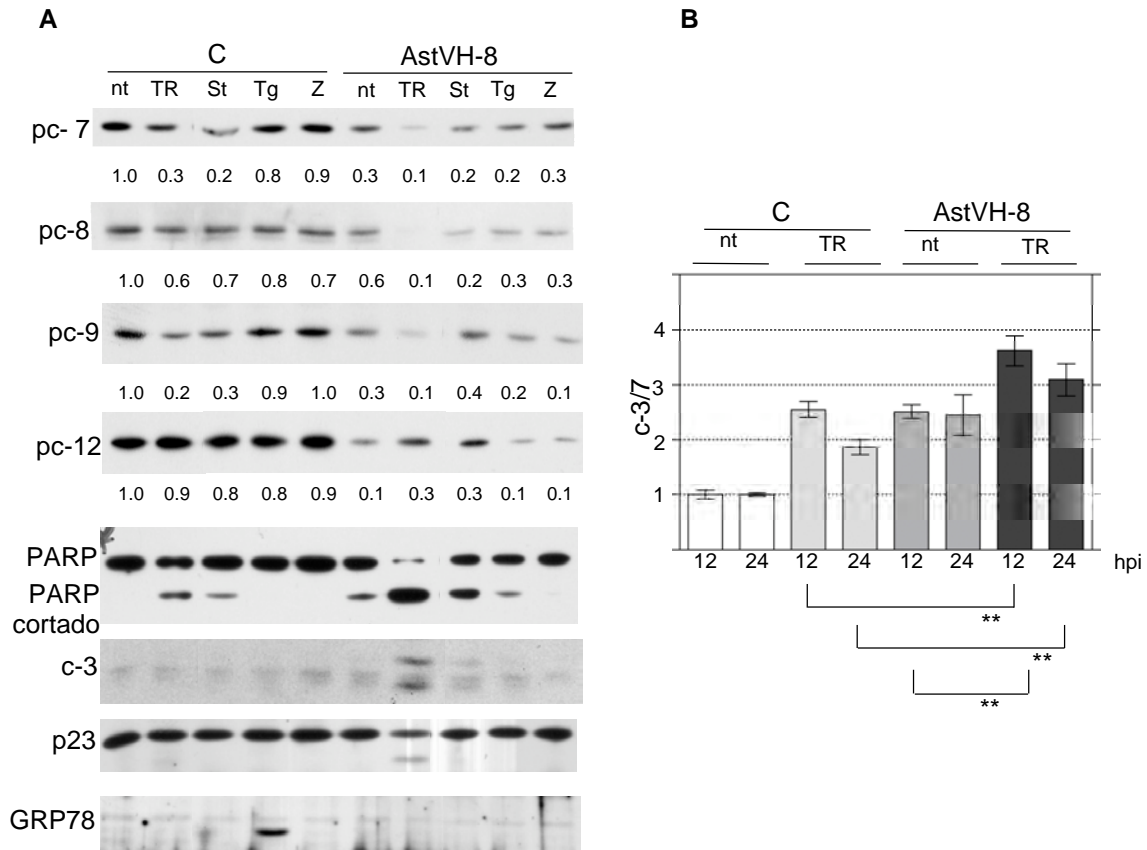


Fig. 10. A. Procesamiento de pro-caspasas (pc) y de sustratos de caspasas en la infección con HAstV-8 en presencia de apoptogénicos. Las células Caco-2 se infectaron a moi de 10 y a las 14 hpi se añadieron los apoptogénicos. A las 20 hpi las células se cosecharon para identificar por wb las proteínas que se indican a la izquierda. Los números en la parte inferior representan la abundancia relativa de la proteína, considerando la tubulina como control de carga. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos TR, TRAIL; Stau, estaurosporina; Tg, taspigargina; Z, Z-VAD; En B Las células se infectaron o trataron como en (A) y a los tiempos indicados se evaluó la actividad de casp 3/7. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes realizados por duplicado y las diferencias significativas **P<0.001.

5.3 Actividad de caspasas en células Hek-293.

5. 3. 1 Caracterización de la infección en células Hek-293.

La actividad de caspasas también se evaluó en células Hek-293. Se eligieron estas células porque en ellas los astrovirus establecen una infección productiva [73] y porque esta línea celular es altamente transfectable; Lo último, nos permitiría hacer estudios genéticos utilizando dominantes negativas de caspasas o sobre expresar las proteasas activas, para confirmar el papel de cada caspasa en la infección. Como primer paso, se caracterizó la infección con AstVH-8 en estas células, analizando los tiempos de producción de virus infecciosos así como de síntesis de proteínas virales.

Se utilizaron 100 veces más partículas físicas para infectar las Hek-293 que para Caco-2, a pesar de esto, la máxima moi alcanzada fue de 0.1, la cual se usó en todos los experimentos subsecuentes. El rendimiento viral en la fracción celular alcanzó valores de 10^7 alrededor de las 12 hpi y se mantuvo así hasta las 24 (Fig. 11A) mientras que en Caco-2 se alcanzaron títulos de casi 10^9 (Fig.1A, apartado 5.1). En el sobrenadante los títulos virales se mantuvieron entre 10^5 - 10^6 durante las 24 h de infección (Fig. 11A) mientras que en Caco-2 se obtuvieron valores cercanos al orden de 10^9 (Fig. 1A, apartado 5.1). Los títulos a lo largo de la infección fueron menores al título del inóculo (tiempo cero, sobrenadante) y se mantuvieron constantes, lo cual sugiere que los virus que se encuentran en esta fracción, podrían no ser de nueva síntesis. Este punto se discutirá más adelante.

Para conocer los tiempos de producción de las proteínas virales, se cosecharon fracciones celulares y sobrenadantes y se analizaron por wb (Fig. 11B y C). En la fracción celular, VP90 se observa alrededor de las 12-16 hpi. A diferencia de lo que ocurre en Caco-2, en Hek-293 VP90 no se procesa a VP70 (Fig. 11B). Las partículas virales de los sobrenadantes tampoco están formadas por VP70 como era de esperarse, sino más bien, por VP25, uno de los productos finales del corte con tripsina, procesamiento necesario para hacer al virus completamente infeccioso [32] (Fig. 12C). La naturaleza de esta proteína se confirma por la similitud en migración que tiene con la VP25 del inóculo (sobrenadante, tiempo cero). Además esta proteína aparece en tiempos muy tempranos de infección (desde las 2 h), cuando aun no hay proteínas de nueva síntesis en la fracción celular (Fig. 11A). Estas evidencias confirman la observación de que las partículas

virales encontradas en el sobrenadante, no son de nueva síntesis; podrían ser virus que inicialmente se adhieren a sus receptores celulares pero que no consiguen penetrar a la célula y tiempo después se eluyen, quedándose en el sobrenadante.

5.3.2 Actividad de caspasas en células Hek-293.

El corte de VP90 en Caco-2 es efectuado por caspasa-3, -4 y -9 (Fig. 5A, apartado 5.1). Como en las células Hek-293 este corte no ocurre, evaluamos si las caspasas se activan en respuesta a la infección; para ello, las células se infectaron a MOI de 0.1 y se cosecharon a las 24 hpi para evaluar la actividad de caspasa. Como control de actividad de caspasas, las células se trataron con estaurosporina. Los resultados de la figura 12 muestran que la infección activa caspasas-2, -6 y -8 pero no caspasa-3/7 (Fig. 12A). Considerando que la actividad de caspasa-3 pudiera ser importante para procesar a VP90 como se observó en Caco-2, la presencia de VP70 fue evaluada en células en las que se indujo actividad de caspasas, tratando con estaurosporina. En la Fig. 12A se observa que la actividad de esta caspasa se incrementa significativamente en células infectadas y tratadas con estaurosporina, y se aprecia la forma cortada de PARP, sin embargo aun en estas condiciones VP90 no se procesa a VP70 (Fig. 12B).

En conjunto los resultados revelan que en esta línea celular se activan algunas caspasas, que VP90 no se procesa y que no hay salida de virus al medio extracelular.

Dado que en estas células, el comportamiento de la infección es diferente que en Caco-2, no nos fueron útiles para confirmar los resultados obtenidos en células Caco-2.

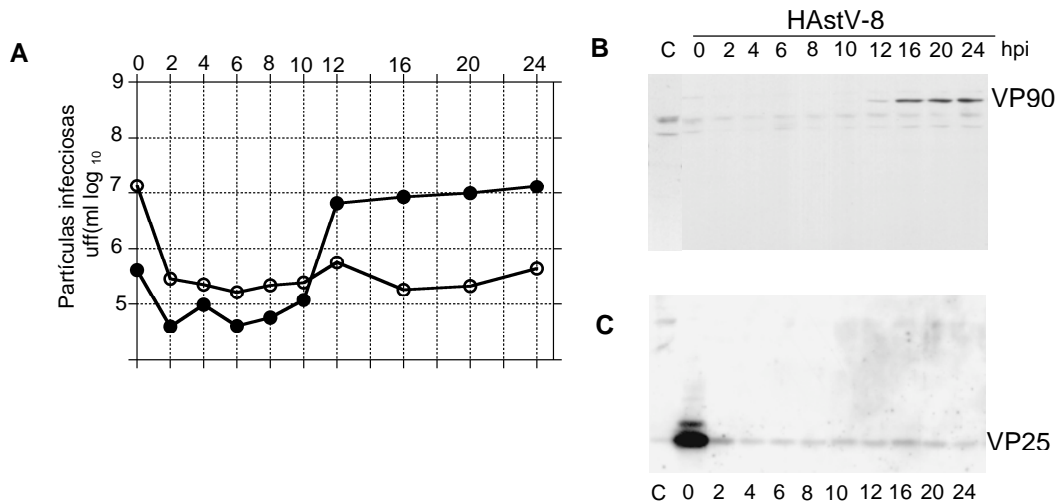


Fig. 11. Infección con HAstV-8 en Hek-293. Las células se infectaron con moi 0.1 y se cosecharon a los tiempos indicados para analizar la producción de partículas virales infecciosas (A) en el sobrenadante (círculos blancos) y en la fracción celular (círculos negros). La producción de proteínas se analizó por wb utilizando anti-Yuc8 como anticuerpo primario, en (B) se muestran las proteínas de la fracción celular y en (C) del sobrenadante.

De estos resultados también se puede observar que la cantidad de VP90 que se produce en presencia de estaurosporina es menor que en el control sin tratamiento. Para analizar si esta reducción ocurría con todas las proteínas virales, se analizaron las proteínas no estructurales. En la Fig. 11B se observa que p27, la proteasa viral, también disminuye, sugiriendo que el tratamiento con estaurosporina disminuye la síntesis de todas las proteínas virales. Cabe mencionar que la estaurosporina también disminuye la expresión de todas las proteínas virales en células Caco-2 (datos no mostrados).

Por otra parte se sabe que en células Caco-2 tratadas con TRAIL, se favorece tanto el procesamiento de VP90 a VP70, como la salida de partículas virales infecciosas [3]. Ya que no se detectó VP70 en la fracción celular en una infección normal, ni induciendo la actividad de caspasa-3/7 con estaurosporina, se pensó que no habría promoción de salida de virus. Para comprobarlo, se valoraron los rendimientos de sobrenadantes y fracciones celulares de infecciones en presencia y ausencia de estaurosporina. Los resultados presentados en la Fig. 12C muestran las relaciones del título viral del sobrenadante con respecto a la fracción celular. Como puede verse no hay incremento significativo de partículas virales en células infectadas en presencia de estaurosporina con respecto al control.

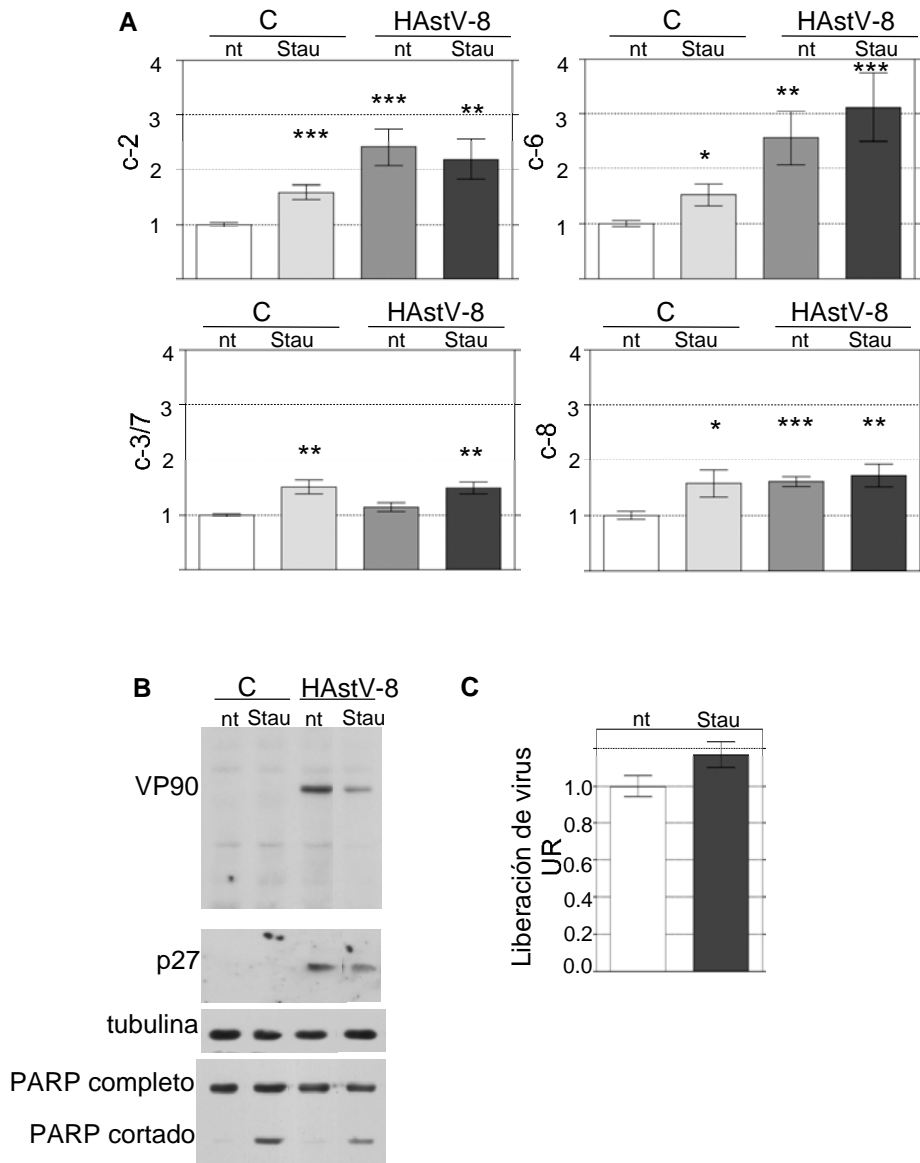


Fig. 12. Actividad de caspasas inducida por AstVH-8 en células Hek-293. Las células se infectaron a moi de 0.1 y se cosecharon a las 24 hpi. El tratamiento con estaurosporina (Stau) se usó como control positivo de actividad de casps. En (A) actividades de las casp que se indican. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes realizados por duplicado, y las diferencias estadísticamente significativas * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$. En (B) las proteínas se analizaron por wb, utilizando anti-Yuc8, anti-1a3, anti tubulina o anti-PARP como anticuerpos primarios para identificar las proteínas que se indican a la izquierda. En (C) Paralelamente se recuperaron células y sobrenadantes y se titularon para determinar el rendimiento viral. Se expresa el rendimiento del sobrenadante con respecto a las células, sin tratamiento (nt) o tratadas con Stau, en unidades relativas (UR). Se muestran resultados representativos.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La respuesta apoptótica inducida por AstVH-8 en células Caco-2 se ha reportado previamente [3] pero, sin que se conociera de este serotipo, el estímulo viral responsable de inducir apoptosis. Para dar respuesta a esta interrogante, cada una de las proteínas de AstVH-8 se expresó transitoriamente en células Caco-2. Las células que expresaron nsp1a, presentaron más frecuentemente los signos apoptóticos evaluados (condensación de cromatina y lamina A/C desintegrada), que las células que expresaron nsp1b o VP90. Estos resultados están en concordancia con los reportados por Guix y colaboradores, quienes al expresar las proteínas del AstVH-4 identificaron a nsp1a como la proteína inductora de apoptosis. Los autores propusieron como elemento inductor de apoptosis un supuesto DD que identificaron en el extremo carboxilo terminal de nsp1a, dentro la proteína hipotética p38 que resulta del procesamiento propuesto por la proteasa viral [27] (Fig. 2D). Sin embargo, la funcionalidad de esta región es materia de discusión, debido a que dentro de su secuencia se ubica un sitio de procesamiento propuesto por otros autores [22].

En nsp1a de los AstVH, también reside la proteasa. Serán proteasas de otros virus de cadena sencilla de RNA y de polaridad positiva, se han identificado como inductoras de apoptosis, tal es el caso de la proteasa NS3 del Virus Dengue de tipo 2. Aunque el mecanismo de inducción de apoptosis no se conoce, se ha sugerido que la proteasa NS3 podría antagonizar la función de las IAPs (*Inhibitory Apoptosis Proteins*), como lo hacen serin proteasas celulares [74]. Por otra parte se sabe que las caspasas-3, -6, -7, -8, y -9 se activan al procesarse por Granzima B. Esta enzima corta preferentemente sobre Asp y Glu [75]; la proteasa de AstVH también hidroliza sobre residuos de Asp y Glu [26], por lo que es posible que la proteasa viral active directamente a las caspasas. Es claro que se requieren más estudios al respecto para elucidar el mecanismo de la proteasa viral como inductora de apoptosis.

Acerca de la ruta de activación de apoptosis, nuestros resultados muestran que las caspasas iniciadoras -8 y -9 se activan simultáneamente alrededor de las 12 hpi (Fig. 2B y C del apartado 5.1). Cuando se silencia cada una de estas caspasas iniciadoras, la actividad de las efectoras-3/7 disminuye significativamente (Fig. 4E, apartado 5.1), lo que sugiere que ambas iniciadoras

son necesarias para activar a las efectoras.

El procesamiento de BID (Fig. 2E, apartado 5.1), sugiere que la respuesta apoptótica podría ser iniciada por caspasa-8, y que posteriormente se activara la caspasa-9. Sin embargo, el silenciamiento de la caspasa-8 no impide el procesamiento de BID (datos no mostrados), así que la activación de caspasa-9 podría no ser consecuencia de la actividad de caspasa-8. Todos estos datos sugieren que más de una caspasa iniciadora podría activarse en la respuesta apoptótica inducida por AstvH-8.

La actividad de caspasa-6 se detectó al rededor de las 3 hpi, más tempranamente que de las otras caspasas (Fig. 9B). La activación de las caspasas efectoras antes de las iniciadoras, no es el orden clásico de activación, sin embargo se ha reportado que las caspasas-3/7 son necesarias para disparar la ruta apoptótica intrínseca [76] Así, las caspasas efectoras podrían activarse antes de las iniciadoras en la infección con HAstV-8 posiblemente activadas por la proteasa viral, como ya se discutió anteriormente. Si la caspasa-6 es la primera en activarse en respuesta a la infección, habría que comprobarlo utilizando otras herramientas.

Por otra parte parece ser que la infección potencia la respuesta de actividad de caspasas inducida por TRAIL (Fig. 10). Se ha reportado que la infección con virus sincicial respiratorio, hepatitis B, y adenovirus sensibiliza a las células a la muerte por TRAIL, generalmente promoviendo mayor actividad de caspasas [77-81]. En todos estos casos se ha encontrado que esta respuesta incrementada, se debe a que se promueve la sobreexpresión de receptores de TRAIL, por lo que la infección con Ast VH-8 podría también inducir la sobreexpresión de estos receptores.

En otro punto, la actividad de caspasas inducida por HAstV-8 se ha descrito necesaria para el procesamiento de la proteína estructural VP90. El inhibidor general de caspasas Z-VAD, bloquea tanto el corte como la salida de virus, por lo que se ha propuesto que el corte es necesario para que el virus se libere de la célula [3]. En este trabajo se encontró que la reducción en la expresión de las caspasas-3, -4 ó -9, resulta en la disminución del corte de VP90, el corte se reduce aproximadamente al 50% (Fig. 5A apartado 5.1), sugiriendo que el corte podría ser ejecutado por más de una caspasa. Las evidencias que fortalecen este argumento son: 1) El cosilenciamiento de caspasa-3 y -9 no bloquea el corte de

VP90 (Fig. 5A apartado 5.1). 2) VP90 es sustrato de la caspasa-8 *in vitro* (Fig. 5B apartado 5.1). 3) La total inhibición del corte de VP90 ocurre solo en presencia de Z-VAD [3]. Las caspasas-2 y -6 que se activan en la infección (Fig. 9) podrían también participar en el procesamiento de VP90, ya que de acuerdo al análisis de la secuencia de la proteína viral con el programa GrabCas [82], ambas podrían procesar a VP90 en los sitios DNHD₇₇₁, EETD₆₇₂, DEND₆₈₃, DEVD₆₈₆; y la caspasa-6 además en VEND₇₀₄ y TYVD₆₅₇. Así, éstas podrían participar en el procesamiento intermediario o en el corte final de VP90.

Aunque el silenciamiento de caspasa-8 no tuvo efecto en el procesamiento de VP90, la proteína traducida *in vitro* si fue sustrato de esta caspasa. La razón por la que VP90 en cultivo celular no se identificó como sustrato de esta caspasa no se conoce exactamente, pero la eficiencia de procesamiento *in vitro* podría ser mayor que *in vivo* como se ha reportado en otros casos [83, 84]. Por otra parte, la presencia de caspasa en los mismos sitios celulares donde se localiza la proteína sustrato, puede definir que el procesamiento ocurra [85]; aunque para la mayoría de las caspasas se ha descrito una localización citoplasmática [86], la caspasa-8 se ha identificado también en mitocondria [87] y en RE [88]. En el caso de las partículas virales que contienen VP90, se han encontrado asociadas a membrana y libres en el citosol [2]. Así, la VP90 podría ubicarse en un sitio diferente al de la caspasa-8, haciéndola poco accesible para su procesamiento. En el procesamiento de VP90 a VP70 ocurren varios cortes en el extremo carboxilo terminal produciéndose intermediarios de 82, 78 y 75 kDa [3]. Un procesamiento similar debe ocurrir por las caspasas *in vitro*, ya que no se detectó ningún producto de 20 kDa con ninguna de las caspasas probadas (datos no mostrados). Como se mencionó, la salida de virus se bloquea con el inhibidor Z-VAD, y este evento se había relacionado con el corte de VP90 [3]. En este trabajo se encontró que mientras que el silenciamiento de las caspasas-3, -4 y -9 redujo el grado de procesamiento casi al 50% (Fig. 5A apartado 5.1), la salida de virus se inhibió al 50, 70 y 80% respectivamente (Fig. 7C apartado 5.1). Lo anterior sugiere que el corte de VP90 y la salida de virus parecen ser eventos independientes; pero relacionados con la actividad de caspasas. La salida de virus fue más afectada en el silenciamiento de caspasa-3, y en presencia del inhibidor de caspasa-3/7 (Fig. 7C y D apartado 5.1), lo que sugiere que la actividad de caspasas efectoras podría estar jugando un papel importante en este evento. Las caspasas efectoras

son las principales responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que llevan a la célula a la muerte [89] por lo que se podría pensar que la salida de virus se debe a la muerte celular, sin embargo, se ha demostrado que aún induciendo la muerte en las células infectadas, no se promueve la salida de virus, y que ésta solo depende de la actividad de caspasas [3]. En algunos casos ocurre necrosis secundaria a la apoptosis, sobre todo en sistemas *in vitro* donde los cuerpos apoptóticos no son fagocitados [90], sin embargo, en las células infectadas con HAstV-8 no ocurre lisis celular (Fig. 7A y B apartado 5.1), lo que sugiere que la necrosis tampoco es el mecanismo de salida de AstvH-8. Todos estos resultados señalan que la salida del virus ocurre por un mecanismo por el momento desconocido, en el cual la caspasa-3 participa de manera importante. La actividad de esta caspasa podría favorecer algún mecanismo de transporte que el virus podría aprovechar para su salida, como se ha descrito para el Ascovirus de *Spodoptera frugiperda*. La actividad de una caspasa codificada por el propio virus, parece necesaria para la formación de vesículas que promueven su liberación [91].

De manera tradicional se ha asumido que los virus no envueltos salen de la célula causando lisis, como se ha descrito para el Virus Coxsackie [92], sin embargo, recientemente se ha sugerido que algunos virus desnudos podrían utilizar un mecanismo no lítico que involucra la participación de vesículas de la maquinaria de autofagia [93]. Aunque no ha habido reportes de autofagia por AstVH, se han observado partículas virales contenidas en estructuras vesiculares en la infección con AstVH-4 [25]. Si éstas vesículas son autofagosomas, o si están involucradas en la liberación de las partículas virales, son temas que aun quedan por explorar. Con estos hallazgos, el modelo de morfogénesis de astrovirus queda como se presenta en la Fig. 13

Se encontraron diferencias importantes en la infección en células Hek-293 con respecto a las Caco-2: Las células son menos permisibles, VP90 no se procesa a VP70, no hay salida de virus, se induce actividad de caspasas-2, -6 y -8 pero no de las efectoras 3/7; aun induciendo la actividad de caspasas con apoptogénicos como estaurosporina, no se promueve el procesamiento de VP90 ni la salida de virus.

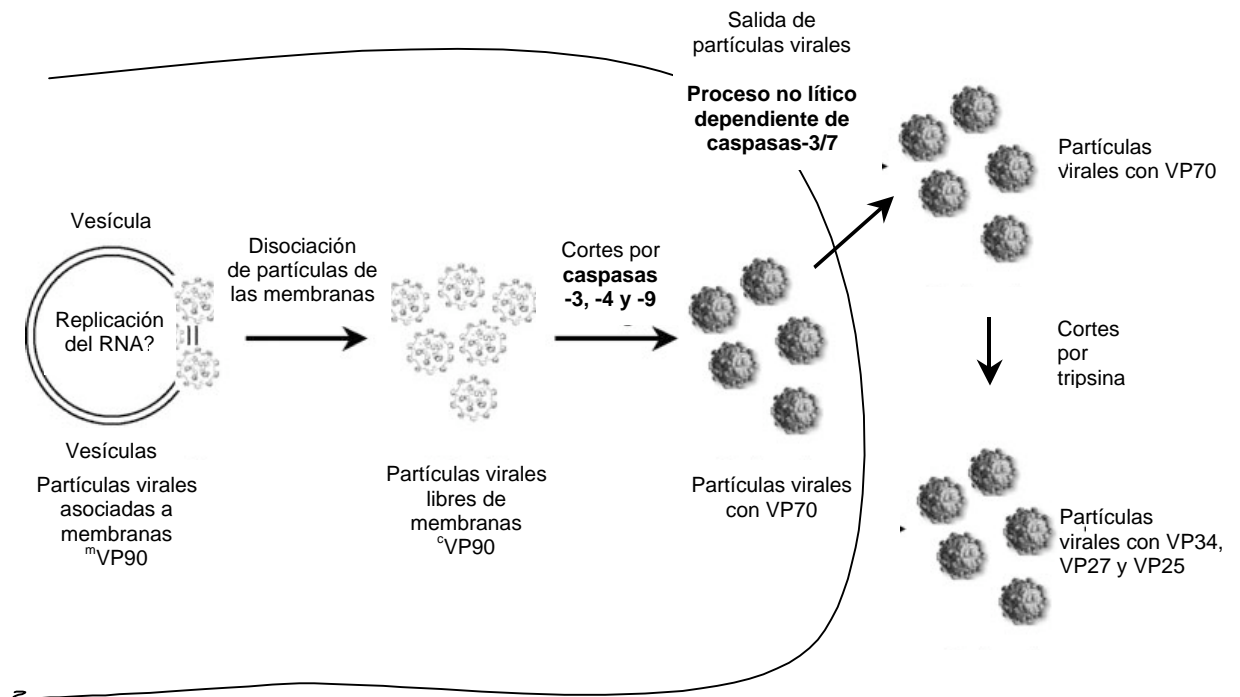


Fig. 13. Morfogénesis de Astrovirus. VP90 se ensambla en partículas virales en asociación con membranas (^mVP90), posteriormente las partículas se liberan de las membranas (^cVP90) y en el citosol, la VP90 de las partículas virales se procesa a VP70 por caspasas-3, -4 y -9. Las partículas virales con VP70 salen al medio extracelular a través de un mecanismo no lítico, en el que las caspasas-3/7 participan importantemente. En el medio extracelular, la VP70 de las partículas virales debe ser procesada por tripsina para hacer al virus completamente infeccioso, rindiendo los productos VP34, VP27 y VP25. Modificado de [2, 3]

La presencia en el sobrenadante de una proteína similar a VP25 desde las 2 hpi, cuando todavía no hay síntesis de nuevas proteínas ni virus infecciosos en la fracción celular (Fig. 11C), sugiere que una parte de los virus adsorbidos, no penetran a las células. Posiblemente en estas células el mecanismo de entrada de AstVH-8 es menos eficiente que en Caco-2, y este factor entre otros, podría contribuir a que las Hek-293 se infecten en menor proporción.

Por otra parte, la especificidad de células para el procesamiento de proteínas virales por caspasas se ha descrito en otro modelo: La proteína de la nucleocápside (N) del coronavirus SARS, es procesada por caspasa-6 en células Vero pero no ocurre tal procesamiento en células. Los autores discuten que la diferencia puede ser la localización subcelular de N [94]. Posiblemente también en nuestro caso, la localización de VP90 ocurra en un sitio diferente poco accesible a las caspasas.

Las diferencias en cuanto a la activación de caspasas y al procesamiento de VP90 sugieren que la infección se establece de manera diferente en las dos

líneas celulares y que activa respuestas diferentes. Uno de los principales factores transcripcionales que se han descrito como reguladores de apoptosis es p53. Esta proteína supresora de tumores se encuentra mutada en la mayoría de células de origen canceroso [95, 96] incluyendo las Caco-2 [97]. Así que la apoptosis inducida por el AstvH en esta línea celular tendría que ser por un mecanismo independiente de p53. Por otra parte p73 es un miembro de la familia de factores transcripcionales de p53 que induce apoptosis dependiente o independientemente de p53 y que no está mutado en células de origen canceroso, por lo tanto, en la apoptosis inducida por AstVH-8 podría activarse p73.

Como primer paso para explorar las diferencias que existen entre estos dos tipos de células, se extrajo RNA de células infectadas y células control y se hizo hibridar con un microarreglo de DNA. El análisis se realizó a las 2 hpi con la intención de conocer la respuesta más temprana una vez que la infección ya está establecida. Los resultados de estos ensayos preliminares muestran que en células Caco-2 se regulan varios genes relacionados con apoptosis, mientras que en Hek-293 no se regula ninguno (tabla 2). Estos resultados sugieren que la apoptosis inducida por AstVH-8 en células Caco-2, es una respuesta compleja en la que se regulan positiva y negativamente genes proapoptóticos. En conjunto, los resultados sugieren que la infección inclina el balance hacia la inducción de apoptosis. Es prudente insistir que estos son resultado preliminares que requieren confirmarse mediante la repetición el ensayo y posteriormente corroborar el nivel de expresión de los genes mediante RT-PCRs y finalmente averiguar el papel que cada uno de ellos juega en la respuesta apoptótica inducida por AstVH-8.

Tabla 2. Expresión genes en células Caco-2 infectadas

Genes regulados positivamente			
Nombre (Nivel de expresión)	Nomenclatura	Descripción	Efecto
<i>BCL2-related protein A1</i> 2.53	BCL2A1 ACC-1 ACC-2 BCL2L5 BFL1 GRS HBPA1	La proteína codificada por este gen reduce la liberación de Citocromo C y bloquea la actividad de casps [98]	Antiapoptótico
<i>BCL2 /adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2</i> 2.22	BNIP2 BNIP-2 Nip2 NR2A2	El gen codifica para una proteína miembro de la familia de las proteínas de interacción con BCL2/adenovirus E1B 19 kD. La función precisa es desconocida, pero interactúa con la proteína E1B19 kDa, responsable de la protección de la muerte celular inducida por virus [99]	Proapoptótico
<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13.</i> 2.34	FAP-1 PTPN13 PTP-BAS PTP-BL PTP1E PTPL1 SUT-1 SUT1	La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de proteínas fosfatasas de tirosina (PTP). Se ha sugerido que tiene un papel en la muerte celular inducida por Fas [100]	Proapoptótica
<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15</i> 2.11	TNFSF15 MGC129934 MGC129935 TL1 TL1A VEGI VEGI192A	Codifica para una citocina de la familia de ligandos de TNF. Es un ligando de receptores TNFRSF25 y TNFRSF21/DR6. Activa NFkB y MAP cinasas y es inductor de apoptosis [101]	Propapotótica
Genes regulados negativamente			
<i>Programmed cell death 5</i> -3.23	PDCD5 TFAR19 MGC9294 FLJ37706, RAD26L	Se expresa más en células que sufren apoptosis. Incrementa la respuesta apoptótica en células tumorales [102]	Proapoptótica

VIII. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la capacidad de diferentes dominios de nsp1a para inducir la actividad de caspasas.
2. Evaluar la sobreexpresión de receptores de TRAIL en respuesta a la infección, como posible respuesta antiviral pro-apoptótica.
3. Estudiar el papel de la casp-3 en la salida de las partículas virales.
4. Analizar exhaustivamente los resultados de la regulación de genes en células Caco-2 como respuesta a la infección.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mendez E, A.C.F., *Astrovirus*, in *Virology*, D.N.K. B. N. Fields, and P. M. Howley, Editor. 2007, Raven Press: New York. p. 982-1000.
2. Mendez, E., et al., *Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis*. J Virol, 2007. **81**(19): p. 10649-58.
3. Mendez, E., E. Salas-Ocampo, and C.F. Arias, *Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses*. J Virol, 2004. **78**(16): p. 8601-8.
4. Bratton, S.B. and G.M. Cohen, *Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego?* Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(6): p. 306-15.
5. Green, D.R. and G. Kroemer, *The pathophysiology of mitochondrial cell death*. Science, 2004. **305**(5684): p. 626-9.
6. Gupta, S., *Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review)*. Int J Oncol, 2003. **22**(1): p. 15-20.
7. Madeley, C.R. and B.P. Cosgrove, *Letter: Viruses in infantile gastroenteritis*. Lancet, 1975. **2**(7925): p. 124.
8. Bjorkholm, M., et al., *Successful intravenous immunoglobulin therapy for severe and persistent astrovirus gastroenteritis after fludarabine treatment in a patient with Waldenstrom's macroglobulinemia*. Int J Hematol, 1995. **62**(2): p. 117-20.
9. Quan, P.L., et al., *Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia*. Emerg Infect Dis. **16**(6): p. 918-25.
10. Moser, L.A. and S. Schultz-Cherry, *Pathogenesis of astrovirus infection*. Viral Immunol, 2005. **18**(1): p. 4-10.
11. Pantin-Jackwood, M.J., E. Spackman, and J.M. Day, *Pathogenesis of type 2 turkey astroviruses with variant capsid genes in 2-day-old specific pathogen free poults*. Avian Pathol, 2008. **37**(2): p. 193-201.
12. Koci, M.D., et al., *Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death*. J Virol, 2003. **77**(21): p. 11798-808.
13. Thouvenelle, M.L., et al., *Astrovirus infection in hatchling turkeys: alterations in intestinal maltase activity*. Avian Dis, 1995. **39**(2): p. 343-8.
14. Moser, L.A., M. Carter, and S. Schultz-Cherry, *Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication*. J Virol, 2007. **81**(21): p. 11937-45.
15. Bonaparte, R.S., et al., *Human astrovirus coat protein inhibits serum complement activation via C1, the first component of the classical pathway*. J Virol, 2008. **82**(2): p. 817-27.
16. Hair, P.S., et al., *Human astrovirus coat protein binds C1q and MBL and inhibits the classical and lectin pathways of complement activation*. Mol Immunol. **47**(4): p. 792-8.
17. Jonassen, C.M., et al., *Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses*. Virus Res, 2003. **91**(2): p. 195-201.
18. Jiang, B., et al., *RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10539-43.
19. Lewis, T.L. and S.M. Matsui, *An astrovirus frameshift signal induces ribosomal frameshifting in vitro*. Arch Virol, 1995. **140**(6): p. 1127-35.
20. Lewis, T.L. and S.M. Matsui, *Astrovirus ribosomal frameshifting in an infection-transfection transient expression system*. J Virol, 1996. **70**(5): p. 2869-75.
21. Mendez, E., et al., *Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8*. J Virol, 2003. **77**(21): p. 11378-84.
22. Geigenmuller, U., et al., *Processing of nonstructural protein 1a of human astrovirus*. J Virol, 2002. **76**(4): p. 2003-8.
23. Willcocks, M.M., A.S. Boxall, and M.J. Carter, *Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 10): p. 2607-11.
24. Guix, S., et al., *Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication*. Virology, 2005. **333**(1): p. 124-31.
25. Guix, S., et al., *C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA*. J Virol, 2004. **78**(24): p. 13627-36.
26. Speroni, S., et al., *Structural and biochemical analysis of human pathogenic astrovirus serine protease at 2.0 Å resolution*. J Mol Biol, 2009. **387**(5): p. 1137-52.
27. Kiang, D. and S.M. Matsui, *Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural*

- protein*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 1): p. 25-34.
28. Mendez-Toss, M., et al., *Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 12): p. 2891-7.
 29. Wang, Q.H., et al., *Genetic analysis of the capsid region of astroviruses*. J Med Virol, 2001. **64**(3): p. 245-55.
 30. Geigenmuller, U., E. Mendez, and M.a.G. Matsui, H.B., *Studies on the molecular biology of human astrovirus*, in *Perspectives in Medical Virology. Virla Gastroenteritis*, U. Desselberg and J.J. Gray, Editors. 2003, Elsevier: Amsterdam. p. 573-586.
 31. Krishna, N.K., *Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology*. Viral Immunol, 2005. **18**(1): p. 17-26.
 32. Mendez, E., et al., *Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein*. J Virol, 2002. **76**(16): p. 7996-8002.
 33. Bass, D.M. and S. Qiu, *Proteolytic processing of the astrovirus capsid*. J Virol, 2000. **74**(4): p. 1810-4.
 34. Belliot, G., H. Laveran, and S.S. Monroe, *Capsid protein composition of reference strains and wild isolates of human astroviruses*. Virus Res, 1997. **49**(1): p. 49-57.
 35. Sanchez-Fauquier, A., et al., *Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization*. Virology, 1994. **201**(2): p. 312-20.
 36. Willcocks, M.M., et al., *Growth and characterisation of human faecal astrovirus in a continuous cell line*. Arch Virol, 1990. **113**(1-2): p. 73-81.
 37. Caballero, S., et al., *Structural requirements of astrovirus virus-like particles assembled in insect cells*. J Virol, 2004. **78**(23): p. 13285-92.
 38. Donelli, G., et al., *Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells*. J Med Virol, 1992. **38**(4): p. 271-7.
 39. Broker, L.E., F.A. Kruyt, and G. Giaccone, *Cell death independent of caspases: a review*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(9): p. 3155-62.
 40. Castedo, M., et al., *Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2825-37.
 41. Fink, S.L. and B.T. Cookson, *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells*. Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 1907-16.
 42. Galluzzi, L., et al., *Cell death modalities: classification and pathophysiological implications*. Cell Death Differ, 2007. **14**(7): p. 1237-43.
 43. Moffitt, K.L., S.L. Martin, and B. Walker, *The emerging role of serine proteases in apoptosis*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 3): p. 559-60.
 44. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
 45. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
 46. Chowdhury, I., B. Tharakan, and G.K. Bhat, *Caspases - an update*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008. **151**(1): p. 10-27.
 47. Fuentes-Prior, P. and G.S. Salvesen, *The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition*. Biochem J, 2004. **384**(Pt 2): p. 201-32.
 48. Fischer, U., R.U. Janicke, and K. Schulze-Osthoff, *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 76-100.
 49. Guicciardi, M.E. and G.J. Gores, *Life and death by death receptors*. Faseb J, 2009. **23**(6): p. 1625-37.
 50. Philchenkov, A., *Caspases: potential targets for regulating cell death*. J Cell Mol Med, 2004. **8**(4): p. 432-44.
 51. Falschlehner, C., U. Schaefer, and H. Walczak, *Following TRAIL's path in the immune system*. Immunology, 2009. **127**(2): p. 145-54.
 52. Thorburn, A., *Death receptor-induced cell killing*. Cell Signal, 2004. **16**(2): p. 139-44.
 53. Korsmeyer, S.J., et al., *Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c*. Cell Death Differ, 2000. **7**(12): p. 1166-73.
 54. Susin, S.A., et al., *Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process*. J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 381-94.
 55. Bao, Q. and Y. Shi, *Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 56-65.
 56. Groenendyk, J. and M. Michalak, *Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis*.

- Acta Biochim Pol, 2005. **52**(2): p. 381-95.
57. Kapoor, A. and A.J. Sanyal, *Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response*. Clin Liver Dis, 2009. **13**(4): p. 581-90.
 58. Nakagawa, T. and J. Yuan, *Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis*. J Cell Biol, 2000. **150**(4): p. 887-94.
 59. Yoneda, T., et al., *Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13935-40.
 60. Rao, R.V., et al., *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33869-74.
 61. Boyce, M. and J. Yuan, *Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death*. Cell Death Differ, 2006. **13**(3): p. 363-73.
 62. Morishima, N., et al., *An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 34287-94.
 63. Fischer, H., et al., *Human caspase 12 has acquired deleterious mutations*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(2): p. 722-6.
 64. Hitomi, J., et al., *Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death*. J Cell Biol, 2004. **165**(3): p. 347-56.
 65. Matsuzaki, S., et al., *Caspase-4 is partially cleaved by calpain via the impairment of Ca²⁺ homeostasis under the ER stress*. Neurochem Int. **56**(2): p. 352-6.
 66. Yukioka, F., et al., *Presenilin-1 mutation activates the signaling pathway of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. Neurochem Int, 2008. **52**(4-5): p. 683-7.
 67. Guix, S., et al., *Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells*. Virology, 2004. **319**(2): p. 249-61.
 68. Vakifahmetoglu-Norberg, H. and B. Zhivotovsky, *The unpredictable caspase-2: what can it do?* Trends Cell Biol. **20**(3): p. 150-9.
 69. Inoue, S., et al., *Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway*. Cell Death Differ, 2009. **16**(7): p. 1053-61.
 70. Wagner, K.W., I.H. Engels, and Q.L. Deveraux, *Caspase-2 can function upstream of bid cleavage in the TRAIL apoptosis pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 35047-52.
 71. Jimbo, A., et al., *ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation*. Exp Cell Res, 2003. **283**(2): p. 156-66.
 72. Rao, R.V., et al., *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell-death program: a novel HSP90-independent role for the small chaperone protein p23*. Cell Death Differ, 2006. **13**(3): p. 415-25.
 73. Lee, T.W. and J.B. Kurtz, *Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin*. J Gen Virol, 1981. **57**(Pt 2): p. 421-4.
 74. Shafee, N. and S. AbuBakar, *Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 8): p. 2191-5.
 75. Poe, M., et al., *Human cytotoxic lymphocyte granzyme B. Its purification from granules and the characterization of substrate and inhibitor specificity*. J Biol Chem, 1991. **266**(1): p. 98-103.
 76. Lakhani, S.A., et al., *Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis*. Science, 2006. **311**(5762): p. 847-51.
 77. Clarke, P., et al., *Reovirus-induced apoptosis is mediated by TRAIL*. J Virol, 2000. **74**(17): p. 8135-9.
 78. Kotelkin, A., et al., *Respiratory syncytial virus infection sensitizes cells to apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*. J Virol, 2003. **77**(17): p. 9156-72.
 79. Liang, X., et al., *Hepatitis B Virus Sensitizes Hepatocytes to TRAIL-Induced Apoptosis through Bax*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 503-10.
 80. Strater, J. and P. Moller, *TRAIL and viral infection*. Vitam Horm, 2004. **67**: p. 257-74.
 81. Zhu, H., et al., *Adenovirus E1A reverses the resistance of normal primary human lung fibroblast cells to TRAIL through DR5 upregulation and caspase 8-dependent pathway*. Cancer Biol Ther, 2006. **5**(2): p. 180-8.
 82. Backes, C., et al., *GraBCas: a bioinformatics tool for score-based prediction of Caspase- and Granzyme B-cleavage sites in protein sequences*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Web Server issue): p. W208-13.
 83. Ferrando-May, E., et al., *Caspases mediate nucleoporin cleavage, but not early*

- redistribution of nuclear transport factors and modulation of nuclear permeability in apoptosis*. Cell Death Differ, 2001. **8**(5): p. 495-505.
84. Lin, C.W., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like protease-induced apoptosis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **46**(3): p. 375-80.
85. Ramuz, O., et al., *Constitutive nuclear localization and initial cytoplasmic apoptotic activation of endogenous caspase-3 evidenced by confocal microscopy*. Int J Exp Pathol, 2003. **84**(2): p. 75-81.
86. Shikama, Y., et al., *Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases*. Exp Cell Res, 2001. **264**(2): p. 315-25.
87. Qin, Z.H., et al., *Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8079-86.
88. Breckenridge, D.G., et al., *The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4331-6.
89. Slee, E.A., C. Adrain, and S.J. Martin, *Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7320-6.
90. Silva, M.T., A. do Vale, and N.M. dos Santos, *Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications*. Apoptosis, 2008. **13**(4): p. 463-82.
91. Bideshi, D.K., et al., *A viral caspase contributes to modified apoptosis for virus transmission*. Genes Dev, 2005. **19**(12): p. 1416-21.
92. van Kuppeveld, F.J., et al., *Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release*. Embo J, 1997. **16**(12): p. 3519-32.
93. Jackson, W.T., et al., *Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses*. PLoS Biol, 2005. **3**(5): p. e156.
94. Diemer, C., et al., *Cell type-specific cleavage of nucleocapsid protein by effector caspases during SARS coronavirus infection*. J Mol Biol, 2008. **376**(1): p. 23-34.
95. Hollstein, M., et al., *p53 mutations in human cancers*. Science, 1991. **253**(5015): p. 49-53.
96. Soussi, T. and K.G. Wiman, *Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm*. Cancer Cell, 2007. **12**(4): p. 303-12.
97. Gartel, A.L., C. Feliciano, and A.L. Tyner, *A new method for determining the status of p53 in tumor cell lines of different origin*. Oncol Res, 2003. **13**(6-10): p. 405-8.
98. Karsan, A., et al., *Cloning of human Bcl-2 homologue: inflammatory cytokines induce human A1 in cultured endothelial cells*. Blood, 1996. **87**(8): p. 3089-96.
99. Boyd, *Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins*. Cell, 1994. **79**(6): p. 1121.
100. Yano, H. and T. Sato, *[FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that is involved in Fas-mediated apoptosis]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 1998. **43**(8 Suppl): p. 1193-9.
101. Migone, T.S., et al., *TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator*. Immunity, 2002. **16**(3): p. 479-92.
102. Chen, Y., et al., *Nuclear translocation of PDCD5 (TFAR19): an early signal for apoptosis?* FEBS Lett, 2001. **509**(2): p. 191-6.

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
AIF	<i>Apoptosis Inductor Factor</i>
ANT	<i>Adenine Nucleotide Transporter</i>
ANV	Avian Nephritis Virus
APAF-1	<i>Apoptotic Peptidase Activating Factor-1</i>
AstV	Astrovirus
AstVH	Astrovirus Humano
Bak	<i>BCL2-antagonist/killer</i>
Bax	<i>BCL2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BID	<i>BH3 Interacting domain Death agonist</i>
CARD	<i>Caspase Recruitmet Domain</i>
CHOP	<i>C/EBP Homologous Protein</i>
Cit-C	Citocromo C
DD	<i>Death Domain</i>
DED	<i>Death Effector Domain</i>
DIABLO	<i>Direct IAP Binding Protein with Low pI</i>
eIF2 alpha	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor alpha</i>
EOR	<i>Endoplasmic reticulum-Overload Response</i>
FADD	<i>Fas Associated Death Domain</i>
GRP78	<i>Glucose regulated protein of 78kD</i>
GRP94	<i>Glucose-Regulated Protein of 94 kDa</i>
hpi	horas post-infección
IMM	<i>Inner Mitochondrial Membrane</i>
IRE-1	<i>Inositol-Requiring-1</i>
kb	kilobases
LMP1	<i>(EBV)-encoded Latent Membrane Protein 1</i>
MCL-1	<i>Myeloid Cell Leukemia sequence 1</i>
moi	<i>multiplicity of infection, multiplicidad de infección</i>
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
nsp	<i>non structural protein, proteína no estructural</i>
nt	nucleótidos

OMM	<i>Outer Mitochondrial Membrane</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , marco de lectura abierto
PARP	<i>Poly ADP Ribose Polymerase</i>
PDI	<i>Protein Disulfide Isomerase</i>
PEMS	<i>Poult Enteritis Mortality Syndrome</i>
PT	<i>Permeability Transition</i>
RE	Retículo Endoplásmico
RNAag	RNA antígenómico
RNAg	RNA genómico
RNAsg	RNA subgenómico
siRNAs	small interfering RNAs
SLN	Señal de Localización Nuclear
Smac	<i>Second Mitochondrial Activator of Caspases</i>
TRADD	<i>TNFR Associated Death Domain</i>
TRAF-2	<i>TNF Receptor-Associated Factor-2</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP Nick</i>
<i>End Labelling</i>	
uff	unidades formadoras de focos
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UR	unidades relativas
VPg	<i>Viral Protein genome linked</i>
wb	<i>western blot</i>