



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Instituto de Biotecnología

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular

**Determinación del Perfil de Fosforilación Tras la
Infección por Rotavirus en Células MA104**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

Lic. En C. Luis Alberto Casorla Pérez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Tomas David López Díaz

CUERNAVACA, MORELOS

Instituto de
Biotecnología





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.

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y FISIOLÓGIA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, CAMPUS MORELOS, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. TOMÁS DAVID LÓPEZ DÍAZ, EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA DIRIGIDO POR LOS DOCTORES CARLOS F. ARIAS Y SUSANA LÓPEZ CHARRETON.

COMITÉ TUTORAL:

DRA. ROSARIO VERA ESTRELLA

DR. CÉSAR FERREIRA BATISTA

JURADO DE EXAMEN:

DRA. CLAUDIA LYDIA TREVINO SANTA CRUZ

DRA. BRONWYN JANE BARKLA

DRA. ROSA VICTORIA PANDO ROBLES

DR. MARTIN GUSTAVO PEDRAZA ALVA

DR. RAMON GONZALEZ GARCÍA CONDE

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ CON EL APOYO DE LAS SIGUIENTES INSTITUCIONES:

DONATIVO 82351. CONSEJO NACIONAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA.

DONATIVO IN-212211. DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DE PERSONAL.

Dedicatorias.

El presente trabajo lo dedico a mi familia por el apoyo brindado durante todos estos años, en particular a mi madre Faustina Pérez Francisco y a mi padre Nolberto Cazorla Martínez. Gracias por su apoyo y espero seguir contando con ustedes. También me gustaría agradecerles a todas las personas que de una u otra forma influyeron en este trabajo. De manera especial, al laboratorio de Carlos Arias/Susana López, a la Unidad de Proteómica en particular al Dr. César Ferreira Batista y a Myriam Rodriguez Gandarrilla por su apoyo y a Ernesto Méndez por los consejos y enseñanzas que compartió durante su vida. A todos gracias.

1. Introducción	7
1.1 Generalidades	7
1.2 Clasificación	8
1.3 Estructura del virión	9
1.4 Genoma	12
1.5 Proteínas No Estructurales.....	13
1.6 Ciclo de Replicación.....	14
2 Antecedentes	16
2.1 Detección de fosfoproteínas	20
2.1.1 Métodos de Enriquecimiento de Fosfoproteínas y Fosfopéptidos	21
2.1.2 Inmunoprecipitación	22
2.1.3 Cromatografía de Afinidad de Iones Metálicos Inmovilizados (IMAC)	23
2.1.4 Dióxido de Titanio	25
2.1.5 Cromatografía de Intercambio Catiónico Fuerte (SXC)	25
2.1.6 Derivaciones Químicas	26
2.2 Proteómica cuantitativa	27
2.2.1 Etiquetado con isótopos estables mediante aminoácidos en cultivo celular (SILAC)	27
2.2.2 Etiqueta de afinidad codificada en isótopos (ICAT)	28
2.2.3 iTRAQ.....	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	32
3.1 Hipótesis:.....	32
3.1.1 Objetivo General:	32
3.1.2 Objetivos Particulares:	33
4. MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1 Descripción general.....	34
4.1.2 Líneas celulares y virus	35

4.1.3 Ensayos de Infección	35
4.1.4 Lisis celular	35
4.1.5 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	36
4.1.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	36
4.1.7 Detección por Western Blot.....	36
4.1.8 Tinción de Plata	37
4.1.9 Purificación de Fosfoproteínas.....	38
4.1.9.1 Purificación por el método de Qiagen	38
4.1.9.2 Purificación de fosfoproteínas por el método en batch	39
4.2 Precipitación con acetona	40
4.3 Extracción de péptidos mediante digestión en gel	40
4.4 Extracción de péptidos mediante digestión en solución	42
4.4.1 Desalado mediante columnas C18	43
4.4.2 Cuantificación de péptidos.....	43
4.5 Purificación de fosfopéptidos empleando columnas IMAC-Galio (Thermo Scientific Pierce Galio Phosphopeptide Enrichment Kit No Cat: 89853)	44
4.6 Purificación de fosfopéptidos empleando columnas de óxido de titanio (Protea Bioscience TiO ₂ SpinTips Sample Prep Kit No Cat: SP-154-24)	44
4.7 Inmunodot blot	45
4.8 Espectrometría de masas.....	45
5. Resultados	47
5.1 Cinéticas de infección de MA104 y Caco.....	47
5.2 Purificación de Fosfoproteínas.....	50
5.3 Purificación de fosfoproteínas por el método en “batch”	51
5.4 Purificación y detección de Fosfopéptidos	54
5.4.1 IMAC.....	54
5.4.2 Ensayo de purificación de fosfopéptidos mediante columnas IMAC-Galio	54
5.4.3 Dot-Blot	58

5.4.4 Purificación de fosfopéptidos empleando columnas de TiO ₂	60
5.4.5 Digestión en solución	62
5.4.6 Etiquetado de muestras por iTRAQ.....	63
5.5 Identificación de cambios en el fosfoproteoma de células MA104 infectadas con rotavirus	64
5.5.1 Eficiencia de la purificación y etiquetado de las muestras	64
5.5.2 Métodos de Fragmentación	66
5.5.3 Proteínas y fosfositios que cambian durante la infección	70
5.5.4 Análisis de redes.....	73
6. Discusión.....	76
7. Conclusiones.....	92
8. Perspectivas	93
9. Referencias	94
10. Apéndice	100

1. Introducción

1.1 Generalidades

Las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En México, del año 2000 al 2008, estas enfermedades ocuparon el primer lugar de mortalidad en niños de edad preescolar. (SINAIS [Sistema Nacional de Información en Salud], 2010. México).

Diversos estudios epidemiológicos han revelado que rotavirus es el principal agente etiológico de gastroenteritis viral en niños [1]. Cada año, rotavirus causa aproximadamente 111 millones de episodios de gastroenteritis que requieren reposo en el hogar, 25 millones de visitas clínicas, 2 millones de hospitalizaciones y alrededor de 600,000 muertes en niños menores a 5 años. A los 5 años, cada niño a nivel mundial habrá tenido aproximadamente un episodio de infección por rotavirus, de los cuáles 1 en 5 recibirán tratamiento clínico, 1 en 65 serán hospitalizados y 1 en 293 morirá como resultado de la infección. Alrededor del 82% de las muertes de infantes causadas por rotavirus suceden en países en vías de desarrollo[1].

La sintomatología típica de la infección por rotavirus es una diarrea severa (más de 8 evacuaciones al día) acompañada de vómito con o sin fiebre. Esta enfermedad tiene una duración promedio de cinco días. La alta mortalidad asociada a esta enfermedad se debe a la exacerbada deshidratación provocada por la infección [2].

Rotavirus infecta principalmente enterocitos maduros localizados en el ápice de las vellosidades del intestino delgado, provocando descamaciones y muerte celular. Se ha sugerido que la proteína viral no estructural NSP4 estimula la secreción de cloro, por una

vía dependiente de calcio, lo cual interfiere con el equilibrio iónico de la célula y resulta en la pérdida de agua, previo a la destrucción del epitelio intestinal por la replicación viral [3].

Rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*. Sus principales características son: 1) el genoma se compone de 11 segmentos de RNA de doble cadena que codifican para seis proteínas no estructurales (de NSP1 a NSP6) y seis proteínas virales estructurales (VP1, 2, 3, 4, 6 y 7); 2) la partícula madura tiene 70 nm de diámetro y una cápside icosaédrica compuesta de tres capas; 3) una RNA polimerasa dependiente de RNA y una enzima que adiciona el cap a los transcritos de RNA; 4) El genoma segmentado de estos virus es capaz de rearrreglarse genéticamente; 5) La replicación viral ocurre en el citoplasma; 6) el tratamiento con tripsina facilita el proceso infeccioso *in vitro*; 7) estos virus presentan una ruta de morfogénesis particular ya que las partículas inmaduras geman hacia el interior de retículo endoplásmico (RE) donde llevan a cabo su maduración; 8) las partículas maduras no tienen envoltura lipídica [4].

1.2 Clasificación

En la actualidad los rotavirus se han clasificado en 7 grupos (A-G) con base a las características antigénicas de la proteína VP6. Los grupos A, B y C infectan tanto humanos como otros animales, mientras los grupos D, E, F y G infectan solo animales. El genoma viral se puede rearrreglar entre miembros del mismo grupo. Los rotavirus del grupo A son la principal causa de gastroenteritis viral y diarrea en niños a nivel mundial. El grupo B se ha asociado a epidemias anuales de diarreas severas principalmente en adultos. El grupo C se ha detectado esporádicamente en heces fecales de niños con diarrea y en brotes severos, principalmente en China [4, 5].

Los grupos de rotavirus se clasifican en diferentes serotipos y genotipos. Los primeros se han caracterizado por ensayos de neutralización con anticuerpos policlonales; mientras que los segundos, están determinados por análisis de hibridación, o por la secuencia de los genes. Debido a que existen dos proteínas blanco de anticuerpos neutralizantes en la cápside externa, VP4 yVP7, surgió una clasificación dual. Para VP7, hay al menos 14 tipos específicos para la proteína, denominados tipos G (derivado de *glicoproteína*). Para VP4, existen al menos 19 diferentes tipos específicos, llamados tipos P (derivado de proteína sensible a *proteasa*). Todos los tipos G y P pueden distinguirse por la secuencia de sus genes. Cada virus tiene un serotipo P indicado por un número que lo precede y es seguido por el genotipo P indicado por un número entre corchetes (por ejemplo P1A[8]) ([6], [7], [8]).

Recientemente, se ha propuesto un nuevo sistema de clasificación para los rotavirus, en el cual se emplean los 11 segmentos de RNA y se basa en porcentajes de identidad para asignar genotipos a cada uno de los segmentos del genoma. La nomenclatura para comparar los genomas completos de rotavirus es la siguiente: G_x-P_[x]-I_x-R_x-C_x-M_x-A_x-N_x-T_x-E_x-H_x los cuales corresponden a los respectivos genes que codifican para VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, donde “x” indica el número del genotipo [9].

1.3 Estructura del virión

Mediante la criomicroscopía electrónica se ha logrado determinar la estructura tridimensional de la partícula viral, la cual tiene una geometría icosaédrica con una simetría T= 13 (**Figura 1**). Diversos ensayos experimentales han permitido identificar tres tipos de partículas que presentan diferentes propiedades. Las partículas maduras presentan tres capas y se denominan TLPs (del inglés *Triple-Layered Particles*). Éstas se caracterizan por

ser las únicas infecciosas ya que tienen la capacidad de reconocer el receptor de las células blanco e infectarlas. Las capas que presentan son las siguientes:

Core o nucleocápside: se compone de las proteínas VP1, 2 y 3 y el RNA viral se encuentra interaccionando con los complejos VP1-VP3. Éstos a su vez interaccionan con la cara interna de la capa formada por VP2 (120 moléculas que forman 60 dímeros) que tiene una geometría icosaédrica con simetría T=1. Diversos estudios indican que VP1 es la RNA polimerasa viral y que ésta requiere la participación de VP2 para llevar a cabo la actividad de replicasa [10, 11]. De igual forma se ha observado que VP3 es la enzima que adiciona el “cap” al mRNA viral ya que tiene la actividad guanililtransferasa además de una actividad metiltransferasa [12, 13]. El diámetro aproximado del core es de 51 nm, mientras que el grosor de la capa de VP2 es de 3.5 nm.

Capa intermedia: se compone de la proteína VP6 (780 moléculas que son el componente estructural más abundante de la partícula viral), esta proteína forma 260 trímeros que interaccionan con 120 moléculas de VP2 y 260 trímeros de VP7. De igual forma en esta capa se encuentran 132 canales, que atraviesan las tres capas de la partícula viral conectando el interior con el exterior. El grosor de esta capa es de 10 nm [4].

Capa externa: está compuesta de las proteínas VP4 y VP7. El principal componente es la glicoproteína VP7 arreglado en 260 trímeros asociados entre sí. La capa formada por VP7 tiene un grosor de 35 nm. La proteína VP4 forma 60 espículas que se proyectan a través de la superficie formada por VP7. VP4 al ser cortada por tripsina, produce las proteínas VP8* y VP5*. Esto resulta en un aumento en la infectividad de la partícula viral [4, 14, 15].

Dado que la estabilidad de la capa externa depende de la presencia de calcio, el uso de agentes quelantes tales como EDTA o EGTA comprometen los trímeros de VP7 induciendo el desensamble de ésta. Cuando esto ocurre, se forma una partícula denominada DLP (del inglés Double-Layered Particles) de apariencia rugosa. Esta partícula se caracteriza por ser incapaz de ingresar en la célula pero si de promover el ciclo de replicación viral al introducirse por transfección. Cuando se hace uso de agentes caotrópicos (por ejemplo tiocianato de sodio) que remueven VP6, se obtienen las nucleocápsides virales, las cuáles no son infecciosas y no tienen actividad transcripcional (**Figura 2**) [11, 16-18].

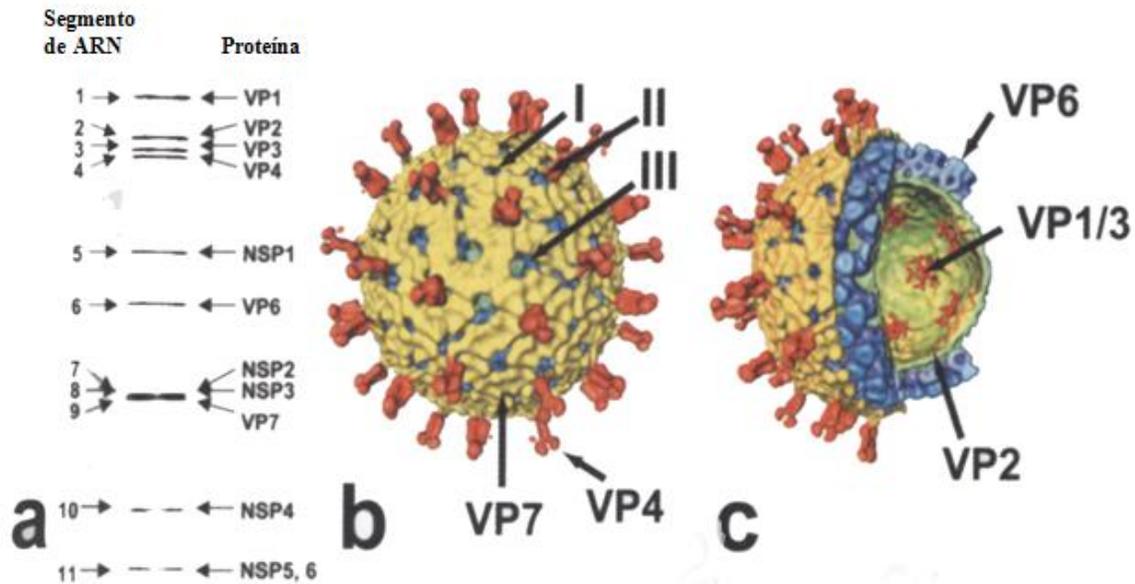


Figura 1. Estructura de rotavirus (Esquema tomado de Estes, M. K. 2001 [4]). En A) se muestra un electroferograma del genoma de rotavirus, en el cual se señalan cada uno de los once segmentos que lo componen. En B) se representa la estructura de una partícula madura TLP, en la cual se señalan proteínas de su superficie como VP4 y VP7. En C) se

señala el componente de la DLP (VP6), así como los componentes del “core” (VP1/3 y VP2).

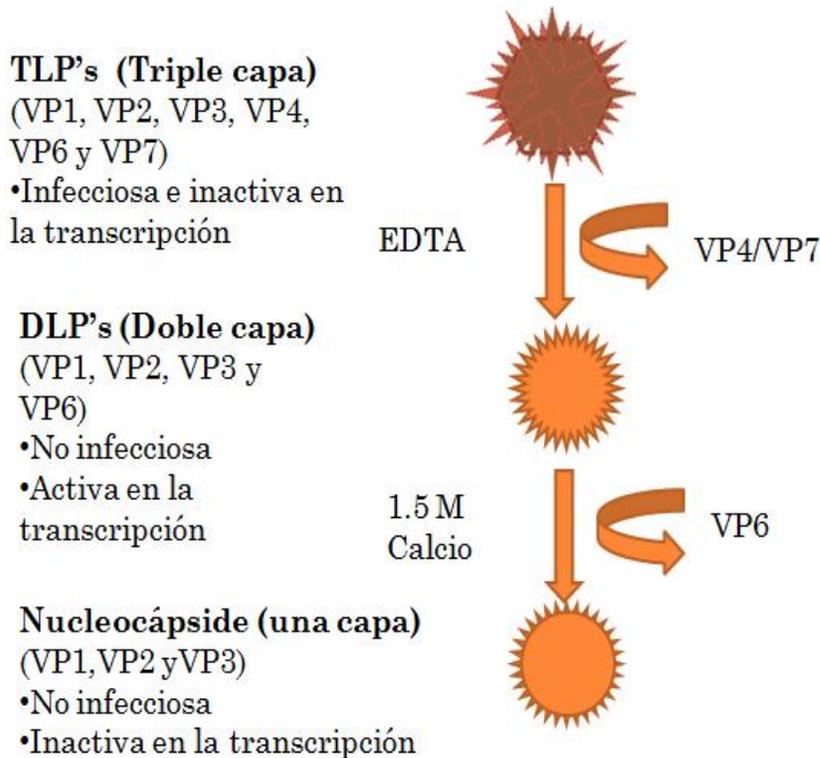


Figura 2. Esquema de los tres tipos de partículas. En esta figura se muestra el proceso por el cual la partícula viral pierde sus capas durante el desarrollo de la infección (**Modificado de** la Figura 1 de Estes, M. K. 2001 [4]).

1.4 Genoma

El genoma se constituye de 11 segmentos de RNA de doble cadena envueltos por la nucleocápside. El tamaño de los segmentos varía de 660-3300 pares de bases. Los primeros 10 segmentos son monocistrónicos y el décimo primero es dicistrónico ya que codifica para NSP5 y NSP6. Seis segmentos de RNA codifican para proteínas estructurales, las cuales forman parte de la partícula viral, y los otros cinco segmentos codifican para proteínas no estructurales que se encuentran en la célula infectada y no forman parte del virión.

Cada mRNA empieza con un 5'-guanidina (cap) seguido de secuencias no traducidas conocidas como 5' UTR (de sus siglas en inglés, región no traducida) y 3' UTR, el cual tiene una secuencia conservada (5'-UGUGACC-3'). La longitud de las regiones no codificantes 5' y 3' varía para diferentes mensajeros. Además nunca se ha observado una señal de poliadenilación en su extremo 3' [4].

1.5 Proteínas No Estructurales

Las proteínas no estructurales (NSP) están involucradas en la replicación (NSP1 a NSP3, 5 y 6) y morfogénesis (NSP4). NSP1 es la proteína viral menos conservada, contiene un dedo de zinc y se ha observado que funciona como una ubiquitina ligasa E3 que media la degradación dependiente de proteosoma de factores regulatorios de interferón, tales como IRF 3, 5, 7 y además reprime la respuesta celular de IFN tipo 1 y NF-kappaB [19]. NSP2 es una NTPasa que se localiza en los viroplasmos y al parecer está involucrada en la encapsidación del RNA. NSP3 se une al extremo 3' del mRNA viral actuando de manera similar a la proteína de unión a poli-A, desplazando a eIF4G (factor de inicio de la traducción eucariote 4G) para inhibir la síntesis de proteínas celulares. NSP5 es una fosfoproteína con sitios de O-glicosilación que tiene actividad autocinasa e interactúa con NSP2 [20, 21]. NSP6 está codificada en un ORF alternativo dentro del segmento 11, interactúa con NSP5 y se acumula en los viroplasmos. NSP2, NSP5 y NSP6 se encuentran asociados a los viroplasmos pudiendo estar involucrados en su formación y en el reclutamiento o movimiento de proteínas virales hacia los viroplasmos [22]. NSP4 es la única proteína no estructural que no es capaz de unirse al RNA y cuya función principal se asocia con la morfogénesis viral y la virulencia. NSP4 es una proteína transmembranal ubicada en el RE y mediante un dominio citoplásmico situado en su extremo carboxilo

terminal se une a partículas de dos capas recién sintetizadas y las “recluta” en el RE como parte de su maduración. También se ha observado que NSP4 induce diarrea, dependiente de edad, en ratones; funcionando como una viroporina que lleva a la secreción trans-epitelial de cloro, por una vía dependiente de Ca^{2+} [23-25].

1.6 Ciclo de Replicación

In vivo, rotavirus infecta principalmente a enterocitos maduros del epitelio intestinal, localizados en el ápice de las vellosidades del intestino delgado. *In vitro*, el virus puede replicarse en células epiteales principalmente intestinales y renales. La gran mayoría de los ensayos de replicación viral se han realizado, *in vitro*, en células de riñón fetal de mono verde (MA-104) [26].

La replicación viral es un fenómeno que en las células MA-104 tiene una duración de 10 a 12 horas a 37 °C. Para que este evento ocurra, se necesita que primero se unan las partículas virales a las células blanco a través de VP8* de manera dependiente de ácido siálico [4]. El mecanismo por medio del cual el virus entra a la célula no se conoce bien, pero se cree que ocurre por un proceso de endocitosis que tiene una duración de alrededor de 60 a 90 minutos [4]. Tras su entrada las partículas virales pierden su envoltura protéica externa generando partículas de dos capas a partir de las cuáles se inicia la transcripción. Se ha propuesto que los transcritos salen a través de canales para llevar a cabo dos funciones: 1) se traducen para sintetizar las proteínas virales y 2) son las cadenas molde a partir de las cuales se sintetiza el RNA de doble cadena para el genoma de la progenie viral (**Figura 3**) [4, 14, 15, 27].

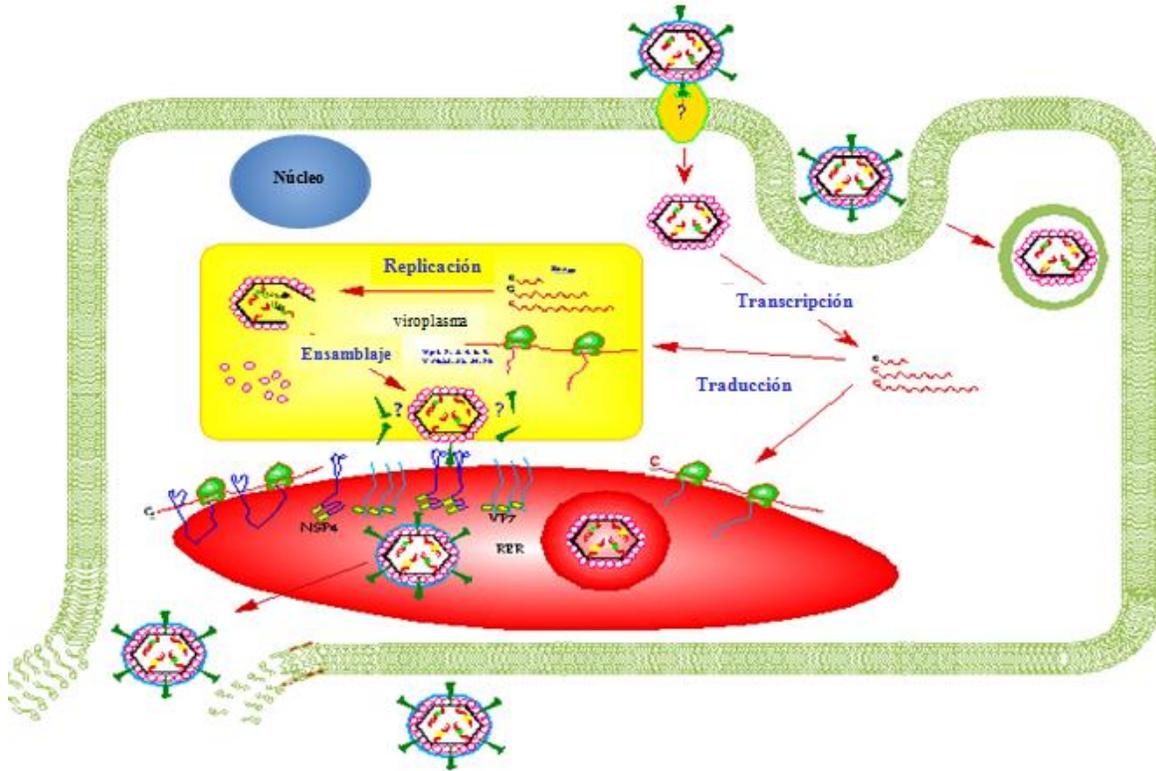


Figura 3. Esquema general de la replicación (Tomado de Estes, M. K. 2001, [4]).

Las proteínas virales sintetizadas en el citoplasma y los mRNAs virales interactúan para formar intermediarios de replicación (RI), nombrados así por presentar actividad de replicasa, cuya función es sintetizar el RNA de doble cadena en sitios conocidos como viroplasma. Los RI se componen de las proteínas VP1, VP2 y VP3 además de que pueden tener asociadas a las proteínas NSP2 y NSP5 [28]. La integración de VP6 a los RI da lugar a partículas conocidas como DLPs (que cuentan con la actividad transcriptasa). Los DLPs maduran a TLPs inicialmente a través del transporte de DLPs hacia RE mediante la interacción de VP6 con NSP4, donde transitoriamente adquieren una envoltura lipídica la cual se pierde, y adquieren las proteínas de capa externa VP4 y VP7 resultando en la formación de una partícula infecciosa. El ciclo de infección finaliza cuando la progenie

viral se libera por lisis celular aunque también se ha descrito que en enterocitos polarizados, la salida ocurre por un transporte vesicular que no resulta en un efecto citopático extenso [4, 28].

2 Antecedentes

Casi todos los aspectos de los procesos celulares son regulados por modificaciones post traduccionales (PTM), las cuáles regulan la activación, degradación, localización subcelular e interacciones proteína-proteína. La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones post traduccionales más amplias en la naturaleza, así como un regulador clave de los procesos biológicos intracelulares y en la actualidad es uno de los más estudiados y mejor comprendidos [29]. La fosforilación de proteínas media diversas redes de señalización que regulan la respuesta celular a diversos estímulos ambientales como estrés mecánico, factores de crecimiento, citocinas, interacciones célula-célula e interacciones célula-matriz, entre otros. Dada la importancia de esta PTM, no es sorprendente que la desregulación de las cinasas y fosfatasa de proteínas haya sido ligada a un vasto número de patologías, incluyendo cáncer, enfermedades autoinmunes, desordenes metabólicos e infecciones por patógenos [29-31].

Los eventos de fosforilación frecuentemente inician y propagan rutas de transducción de señales. La fosforilación de una proteína es una PTM transitoria y reversible que lleva a cambios conformacionales, de actividad y capacidad de interactuar con otra proteína dentro de un intervalo de tiempo muy corto. Ya que la modificación es reversible, los cambios en la actividad de la proteína pueden ser regulados estrictamente por eventos de fosforilación y defosforilación en respuesta a estímulos celulares o ambientales. La

fosforilación a menudo ocurre en múltiples residuos dentro de una proteína y en muchos casos por diversas cinasas [32]. Los múltiples sitios de fosforilación le permiten a la proteína realizar diversas funciones dependiendo de cual sitio se encuentre fosforilado. Por ejemplo, la proteína del retinoblastoma (pRb) tiene como función la inhibición de la proliferación celular a través de la interacción con E2F, reprimiendo la transcripción de genes regulados por esta proteína. pRb tiene 16 sitios potenciales de fosforilación los cuáles se ha demostrado que la fosforilación en cualquiera de estos sitios lleva a un cambio conformacional que interrumpe la interacción entre pRb-E2F y de esta manera se permite el avance en el ciclo celular [33].

La fosforilación está regulada por una compleja interacción entre cinasas y fosfatasa específicas, las cuales mantienen un estricto control espacial y temporal de los eventos de fosforilación y defosforilación en sitios específicos de las proteínas blanco. En eucariontes, la fosforilación tiene lugar en residuos de serina, tirosina y treonina. La presencia de fosforilación en residuos de serina y treonina es más frecuente que en residuos de tirosina, con una proporción de pSer/ pThr/ pTyr del orden de 1800:200:1 [32].

Las cinasas eucarióticas constituyen una gran super familia de proteínas homólogas que se agruparon en base a la similitud de sus dominios catalíticos que es de alrededor de 250-300 aminoácidos. Dentro de esta gran super familia hay dos principales subdivisiones: las serina/ treonina cinasas y las tirosina cinasas [34]. Se ha estimado que cerca del 50% de todas las proteínas son fosforiladas en un momento determinado y que existen cerca de 100,000 sitios potenciales de fosforilación en el proteoma humano [35]. La secuenciación del genoma humano ha revelado que existen alrededor de 518 cinasas y se han predicho por

anotación genómica la existencia de más de 100 fosfatasa, enfatizando el papel ubicuo de la fosforilación y defosforilación de proteínas [36]. A pesar de su papel ubicuo, las fosfoproteínas están generalmente presentes en una relativamente baja abundancia dentro de la célula y las formas fosforiladas de las proteínas individuales también tienden a estar presentes en mucha más baja proporción que sus contrapartes no fosforiladas. Mientras algunas proteínas son constitutivamente fosforiladas, la mayoría sólo lo son de manera transitoria [37, 38].

Durante la infección por rotavirus se ha observado que las cinasas JNK (Cinasa NH₂ terminal c-Jun) y p38 promueven la activación del factor de transcripción AP-1 que resulta en la expresión de IL-8, el cual es una potente citocina pro inflamatoria [39]. De igual forma se ha observado la activación de NFκB tras la infección por rotavirus. Se ha reportado que durante la infección se activan dos proteínas pertenecientes a la familia RLR (del inglés RIG-1 like receptor) RIG-1 y MDA5. Estas proteínas se activan en presencia de RNA de doble cadena viral y a su vez promueven la activación de una molécula adaptadora llamada MAVS (del inglés Mitochondrial antiviral signaling protein) que resulta en la producción de INF-β cuya secreción al medio externo es regulada por PKR [40, 41]. Por otro lado, durante la infección ocurren cambios en la interacción entre las células intestinales y su ambiente. El crecimiento y supervivencia de las células epiteliales intestinales, las cuáles como se ha mencionado anteriormente son los blancos principales de rotavirus, dependen de las interacciones entre componentes de matriz extracelular e integrinas de superficie celular. Un resultado interesante durante la infección es la regulación de la expresión de integrinas en la que está involucrado la ruta del fosfoinositido 3-cinasa (PI3K/Akt). Cuando se bloquea la regulación de integrinas mediante el uso de

drogas que impiden la activación de PI3K, esto resulta en la reducción de la adherencia de las células intestinales infectadas y una disminución concomitante en los títulos virales. Estos hallazgos sugieren que la activación de PI3K inducida por rotavirus resulta en la regulación de la expresión de integrinas de células intestinales, lo cual lleva a una adherencia más prolongada de las células infectadas a colágeno y a una mayor producción viral [42]. La vía PI3K/Akt también puede ser activada por proteínas de choque térmico como HSP90, la cual se ha demostrado que puede interactuar con Akt y activarla mediante su fosforilación. Esto lleva a la fosforilación de proteínas río abajo de Akt tales como 4EBP, mTOR y p70S6K (**Figura 23**). De hecho se ha demostrado que la inhibición de la ruta PI3K/Akt o su activador HSP90 con drogas o interferentes, lleva a la disminución de transcritos virales, proteína viral así como título viral [43]. Durante la infección también se ha observado que eIF2 α se fosforila. Este factor es un regulador clave en la síntesis de proteínas ya que se encarga de entregar el Met-tRNA iniciador al ribosoma. La fosforilación de este factor resulta en la inhibición de la formación del complejo de pre inicio de la traducción. Resultando en la disminución de la síntesis de proteínas celulares y favoreciendo la traducción de los mensajeros virales por un mecanismo desconocido. Asimismo, se ha observado que PKR al activarse por reconocimiento de RNA de doble cadena viral, es la proteína que dispara la fosforilación de eIF2 α [44, 45].

2.1 Detección de fosfoproteínas

Ya que los eventos de fosforilación que ocurren durante la infección por rotavirus no han sido completamente caracterizados. Como primer paso para elucidarlos, es necesario poder detectar las fosfoproteínas involucradas en tales eventos de señalización.

Tras la lisis celular, muchas proteasas y fosfatasas se activan y si no se toman las precauciones necesarias, las proteínas se degradan y los grupos fosfatos se remueven. Es por esto que se deben procesar las muestras a 4 °C, ya que a esta temperatura la actividad de las proteasas y fosfatasas se reduce; y se debe agregar inhibidores de proteasas y fosfatasas en todos los buffers que se usan en los pasos iniciales de la solubilización de la muestra y digestión enzimática. De igual forma, es necesario inhibir la actividad de las cinasas para identificar los sitios de fosforilación de verdadera relevancia biológica.

Usualmente, la detección de proteínas fosforiladas en muestras complejas no es posible sin una previa separación, por ejemplo, en geles de dos dimensiones (2-DE). Las fosfoproteínas se pueden visualizar directamente en el gel 2-DE mediante tinción fosfoespecífica, western blot o marcaje radiactivo [46-48]. Las principales ventajas de estas técnicas es que se pueden detectar todos los tipos de fosforilación y se pueden cuantificar las señales de manera absoluta. El método más sensible es el marcaje radiactivo de los grupos fosfato usando ^{32}P o ^{33}P [48, 49]. Los grupos fosfato radiactivos se pueden introducir *in vivo* o *in vitro*. Cuando se hace *in vitro*, este puede llevarse a cabo incubando la proteína o la mezcla de proteínas con la cinasa seleccionada y $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. La principal desventaja es la fosforilación inespecífica debido a las altas concentraciones de reactivo. La incorporación de grupos fosfatos radiactivos *in vivo* se lleva a cabo incubando ^{32}P con las

células, tejido, órgano u organismo. Aunque las condiciones de reacción son mucho mejores en células vivas que *in vitro*, de igual forma ocurren fosforilaciones inespecíficas [49]. Además, proteínas fosforiladas constitutivamente con baja tasa de intercambio de grupos fosfato incorporan muy pocas cantidades de radiactividad y por lo tanto pueden escapar de la detección.

Otra forma para detectar fosfoproteínas, es la tinción fosfoespecífica, la cual es menos sensible (detecta solo de 1-16 ng de fosfoproteína) por banda en un gel que los métodos radiactivos pero el manejo de los reactivos es mucho menos peligroso y es compatible con MS. Un ejemplo de tinción fosfoespecífica es Pro-Q Diamond (Molecular Probes), el cual es un fluoróforo que se une a los grupos fosfato permitiendo detectar proteínas fosforiladas en un gel de electroforesis *in vitro* [50, 51].

Otro método que es capaz de detectar bajas cantidades de fosfoproteínas (del orden de femtomoles), es el western blot. Sin embargo, la especificidad y sensibilidad del método depende de los anticuerpos fosfoespecíficos empleados [46, 48, 52].

2.1.1 Métodos de Enriquecimiento de Fosfoproteínas y Fosfopéptidos

Las fosfoproteínas principalmente se caracterizan usando métodos de espectrometría de masas posterior a la digestión con tripsina, sin embargo, los fosfopéptidos son notoriamente difíciles de analizar en el espectrómetro de masas, especialmente por la presencia de péptidos no fosforilados, ya que impiden una adecuada ionización de los fosfopéptidos y por lo tanto disminuyen su detección [46]. Así, un enriquecimiento eficiente de las especies fosforiladas antes del análisis por el espectrómetro de masas resultará en una mayor sensibilidad y como consecuencia una caracterización más eficiente. La cromatografía de

Afinidad de Iones Metálicos Inmovilizados (IMAC) y la inmunoprecipitación son métodos de enriquecimiento tanto de fosfoproteínas como de fosfopéptidos. Otras opciones para la purificación de fosfopéptidos son las columnas de dióxido de titanio (TiO_2) y las derivaciones químicas (Figura 4; [35, 38, 46, 53-55]).

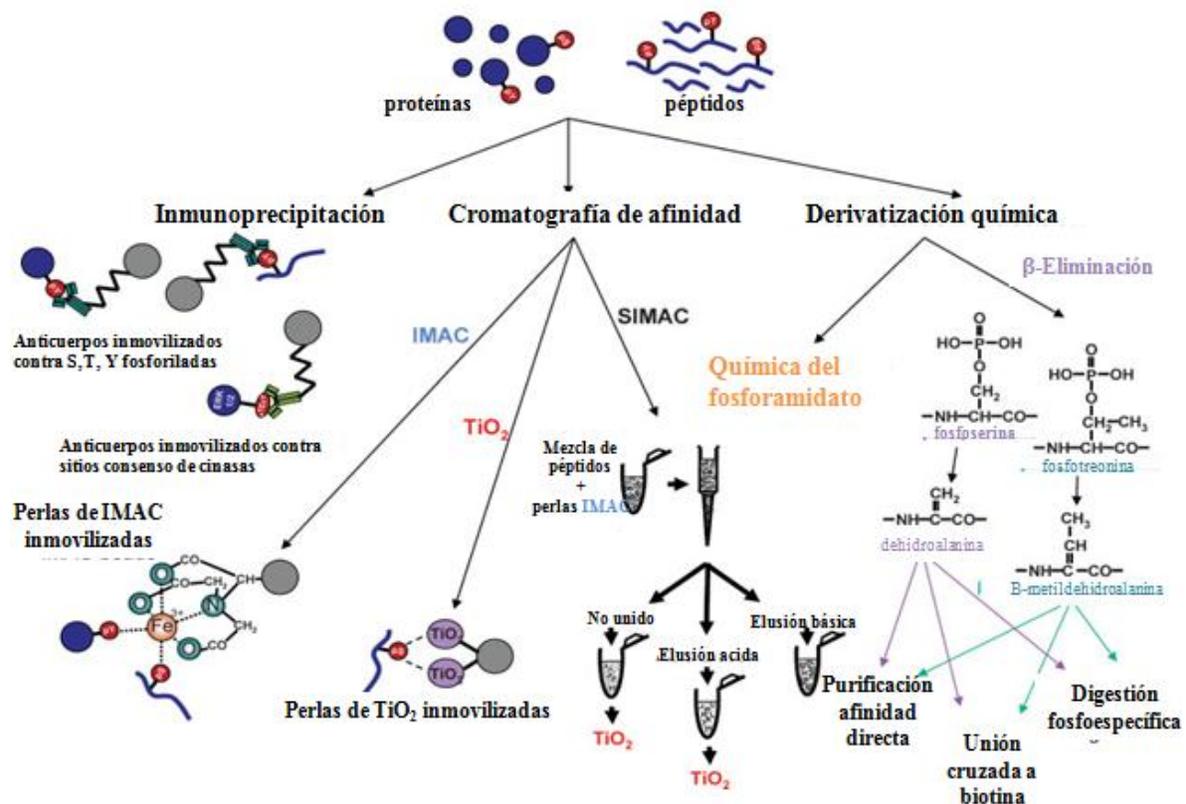


Figura 4. Estrategias utilizadas para el enriquecimiento de fosfopéptidos (Tomado de Thingholm, Tine E. Jensen, Ole N y Larsen Martin R. [46]). Se representan las principales estrategias para la purificación de fosfoproteínas y fosfopéptidos.

2.1.2 Inmunoprecipitación

Este método hace uso de anticuerpos específicos contra residuos fosforilados que precipitan las proteínas o péptidos fosforilados de las proteínas totales. Dentro de esta estrategia la inmunoprecipitación de fosfotirosinas es la más común. Ya que los anticuerpos contra

fosfotirosinas son de buena especificidad y poca reactividad cruzada contra tirosinas no fosforiladas o serinas/treoninas fosforiladas [56]. Mientras que los anticuerpos contra serina o treonina fosforilada son mucho menos específicos [57].

2.1.3 Cromatografía de Afinidad de Iones Metálicos Inmovilizados (IMAC)

Se introdujo inicialmente por Porath *et al* en 1975 para la purificación de proteínas etiquetadas con una cola de histidinas. Sin embargo, posteriormente Andersson demostró que podían unir grupos fosfato [35]. Actualmente es una de las técnicas usadas para la purificación de fosfoproteínas y fosfopéptidos [54]. IMAC es una técnica que utiliza la afinidad diferencial de las proteínas hacia los iones metálicos inmovilizados para mejorar su separación. Esta afinidad diferencial surge de los enlaces coordinados formados entre los iones metálicos y las cadenas laterales de ciertos aminoácidos expuestos en la superficie de las proteínas. Las proteínas o péptidos fosforilados se unen a la fase estacionaria de la columna mediante interacciones electrostáticas de sus grupos fosfato cargados negativamente con los iones metálicos inmovilizados cargados positivamente. Estos iones metálicos pueden unirse a la columna a través de resinas de ácido nitriloacético (NTA), ácido iminodiacético (IDA) o Tris-etilendiamina (TED) (Figura 5) [32].

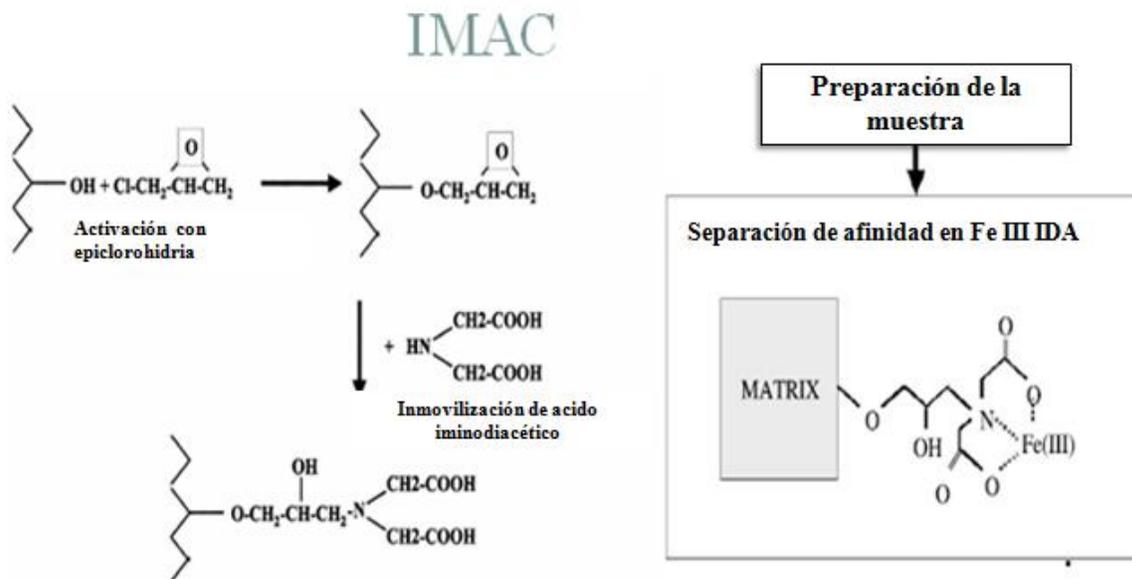


Figura 5. Columnas IMAC (Tomado de Imam-Sghiouar, N., R. Joubert-Caron, y M. Caron, [58]).

Esta técnica facilita la recuperación e identificación de fosfopéptidos en muestras complejas. Sin embargo, una de las principales desventajas de la técnica, es que permite la unión inespecífica de péptidos no fosforilados que contienen aminoácidos ácidos como Glu y Asp, por lo cual pueden co-purificar con los fosfopéptidos reduciendo la selectividad del método [59]. Para superar esta desventaja se han implementado mejoras a la técnica como usar buffers de resuspensión con pH 3.5, ya que a este pH los péptidos ácidos tienen carga neutra mientras los fosfopéptidos están casi en su totalidad ionizados [55, 60-62]. De igual forma, incubar la muestra con acetonitrilo reduce la unión inespecífica hacia la columna e incrementa la especificidad hacia los fosfopéptidos. Por otro lado, otra forma de aumentar la eficiencia de la columna, se logra al disminuir la complejidad de la muestra pre fraccionándola usando columnas de intercambio catiónico fuerte [60]. Sin embargo, para esto se requieren grandes cantidades de muestra. Los fosfopéptidos son eluidos de la columna usando buffers alcalinos como bicarbonato de amonio. De manera alterna, los

fosfopéptidos se pueden eluir con EDTA, soluciones muy ácidas o soluciones que incluyan fosfato o ácido fosfórico. Una vez que se obtiene el eluido es conveniente desalar y concentrar antes de analizar por MS. IMAC ha llegado a ser muy popular debido a su compatibilidad con las subsecuentes técnicas de separación y detección tales como electrospray y MALDI ; además de que se ha reportado una eficiencia de purificación entre 70 % al 90% [32].

2.1.4 Dióxido de Titanio

El dióxido de titanio se emplea en columnas para la purificación de fosfopéptidos y se basa en la interacción selectiva de los fosfatos solubles en agua con microesferas de dióxido de titanio. Los fosfopéptidos se retienen en una columna de TiO_2 bajo condiciones ácidas y posteriormente se liberan en condiciones alcalinas [63]. Estas columnas de dióxido de titanio tienen una alta especificidad por los fosfopéptidos, sin embargo, también presentan cierta afinidad por péptidos ácidos no fosforilados. Recientemente se ha descubierto que el uso de ácido dihidroxibenzoico (DHB) reduce la unión de péptidos no fosforilados mientras retiene su alta afinidad por los fosfopéptidos, resultando esta técnica más selectiva que el IMAC [64]. Otra de las principales ventajas de esta técnica es que puede ser acoplada fácilmente a espectrometría de masas [32].

2.1.5 Cromatografía de Intercambio Catiónico Fuerte (SXC)

Originalmente la cromatografía de intercambio catiónico se usaba para el pre fraccionamiento de proteínas y péptidos, donde los grupos cargados positivamente (cationes) interactúan con los grupos cargados negativamente (aniones) de la resina de la columna. El pH y la fuerza iónica de los buffers usados para la carga y elución de los péptidos pueden ser modificados para promover la unión y elución de diferentes moléculas.

Esta técnica permite la purificación de fosfopéptidos y se basa en el hecho de que bajo condiciones ácidas (pH 2.7) los péptidos trípticos tienen una carga +2 debido a la carga del extremo C-terminal de la arginina o lisina así como a la carga de su extremo N-terminal. Los monofosfopéptidos que llevan la carga negativa del grupo fosfato tienen una carga +1. Por lo tanto, se espera que los fosfopéptidos muestren una unión más débil a la columna SCX y eluyan antes que los péptidos no fosforilados que muestran múltiples cargas positivas[65]. Para estudios fosfoproteómicos a gran escala es recomendable usar SCX como técnica de pre-fraccionamiento antes del enriquecimiento de fosfopéptidos usando IMAC o columnas de TiO₂ [46, 66].

2.1.6 Derivaciones Químicas

La derivación química es otra estrategia para la purificación de fosfopéptidos. Una variedad de derivaciones químicas se han empleado para el etiquetado de grupos fosfato en péptidos y proteínas. Bajo condiciones alcalinas, la β -eliminación de grupos fosfato presentes en residuos de serina y treonina produce dehidroalanina y β -metildehidroalanina respectivamente. Mediante la subsecuente adición de un compuesto que contiene un grupo sulfidrilo libre para la dehidroalanina o β -metildehidroalanina por la reacción de Michael, un di-tiol se crea en el péptido, el cual puede servir como un cross-linker para una etiqueta de biotina o para la purificación directa por afinidad [67, 68]. La desventaja general de la β -eliminación es la contaminación de péptidos con otras modificaciones que también sufren β -eliminación, tales como O-glicosilaciones. Además, la estrategia no puede ser aplicada a péptidos fosforilados en tirosinas y se ha observado el etiquetado de serinas no fosforiladas [68]. En el 2001, se introdujo una estrategia que puede ser aplicada a todos los residuos fosforilados llamada química del fosforamidato (PAC). Inicialmente, el grupo carboxilo del

péptido es O-metil esterificado para impedir su reactividad en los siguientes pasos y purificación inespecífica. Los fosfopéptidos se derivatizan con un grupo sulfidrilo y subsecuentemente se ligan a grupos iodoacetilo inmovilizados en un soporte sólido de polímero sintético o perlas de vidrio a través del PAC. Los grupos fosfato se reconstituyen por hidrólisis ácida de los puentes fosforamidato, facilitando la identificación de los sitios de fosforilación por MS. Sin embargo, la carga de trabajo de la estrategia es muy extensa debido a las diversas reacciones químicas y la muestra puede perderse en cada paso, especialmente durante la O-metilesterificación [46, 69].

2.2 Proteómica cuantitativa

La proteómica cuantitativa es una poderosa herramienta que permite identificar proteínas así como comprender la dinámica global de expresión de proteínas. Ya que brinda información cuantitativa de las proteínas en diferentes muestras. Podemos clasificar la proteómica cuantitativa como absoluta y relativa. La proteómica cuantitativa relativa consiste en analizar las muestras por espectrometría de masas (MS) y comparar los espectros de cada péptido para determinar las abundancias en cada muestra. En la proteómica cuantitativa absoluta se emplea un péptido control cuya concentración es conocida y en base a este péptido se compara la intensidad de la señal del péptido en la condición experimental [35, 70].

2.2.1 Etiquetado con isótopos estables mediante aminoácidos en cultivo celular (SILAC)

Las estrategias de etiquetado metabólico hacen uso de distintos medios definidos isotópicamente para introducir aminoácidos de una masa isotópica única en la composición bioquímica de una población celular. La mezcla de lisados celulares derivados de distintos

medios isotópicos permite la separación de especies idénticas bioquímicamente (por ejemplo el mismo péptido) mediante su masa usando métodos basados en espectrometría de masas. Una de las estrategias de etiquetado metabólico más ampliamente utilizada y bien conocida es el etiquetado con isótopos estables mediante aminoácidos en cultivo celular (SILAC). En esta estrategia sólo un aminoácido específico es etiquetado isotópicamente, permitiendo que la masa del péptido pesado y ligero sea fácilmente predeterminada y detectable por el análisis MS [71, 72]. El medio en el cual cada aminoácido es etiquetado isotópicamente con ^{15}N o ^{14}N se emplea para cuantificar la dinámica de fosforilación. En algunos ejemplos como en células vegetales, los aminoácidos etiquetados son ineficientemente incorporados en la población celular. Por ejemplo, células de *Arabidopsis* solo incorporan parcialmente los aminoácidos etiquetados isotópicamente [73]. Aunque las técnicas de marcaje metabólico requieren de una manipulación reducida (por ejemplo modificaciones químicas), tienen cierta desventaja ya que son caros porque se requiere de un gran volumen de medio de crecimiento [37, 70].

2.2.2 Etiqueta de afinidad codificada en isótopos (ICAT)

Es una técnica proteómica específica de grupos tioles. Cada reactivo ICAT consiste de tres grupos esenciales: un grupo reactivo que se une a tioles; un linker que tiene un isótopo ligero o pesado y un segmento de biotina que facilita el enriquecimiento de péptidos [74]. El procedimiento general con ICAT inicia con el etiquetado de las muestras de proteínas con ICAT pesados y ligeros en el grupo tiol de los residuos de cisteína. Las mezclas de proteínas etiquetadas se digieren por tripsina y posteriormente se separan a través de múltiples pasos de separación cromatográfica. Los péptidos se identifican por espectrometría de masas en tándem, y las cuantificaciones relativas de los péptidos se

inferen a partir de los picos de las versiones ligeras y pesadas de los péptidos etiquetados con ICAT. Ya que solamente se pueden aislar péptidos que contienen cisteínas, la mezcla de péptidos es menos compleja, lo cual puede ser una ventaja para la cuantificación de muestras complejas. Por otro lado, algunas proteínas no contienen cisteínas y otras solamente se cuantifican a partir de un solo péptido. De igual forma, el tamaño de la etiqueta es grande, ya que influye en el patrón de fragmentación y puede hacer difícil la identificación del péptido [70].

2.2.3 iTRAQ

La estrategia de etiquetado isobárico para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) se introdujo hace varios años e involucra la unión de una molécula al extremo N-terminal del péptido o NH_2 de un residuo de lisina. El kit inicialmente incluía cuatro etiquetas isobáricas, así, cuatro muestras separadas podrían ser etiquetadas diferencialmente y combinadas; aunque actualmente se dispone de hasta ocho etiquetas diferentes que permiten el análisis de ocho condiciones diferentes.

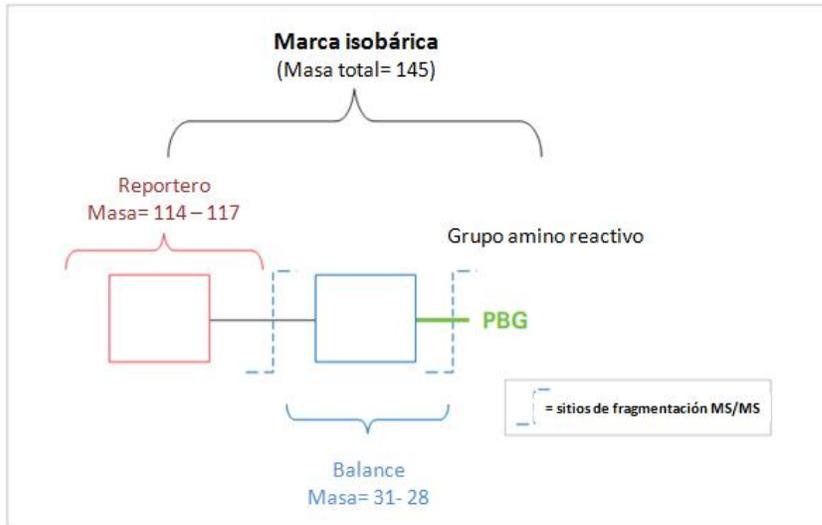


Figura 6. Estructura del iTRAQ. Se representa la estructura de la etiqueta y el sitio de unión a péptidos (Tomado de Product bulletin iTRAQ Reagents, www.appliedbiosystems.com)

El iTRAQ consiste de un grupo reportero que indica la abundancia relativa de cada péptido en cada condición; un equilibrador o “balancer” que permite que todas las etiquetas tengan la misma masa (145 Da) y un grupo reactivo que permite la unión al péptido (Figura 6).

Después de etiquetar los péptidos provenientes de cada condición y combinarlos, inicialmente al someterlos al MS se observa un solo pico para los mismos péptidos provenientes de diferentes condiciones.

Después de fragmentarlos en el espectrómetro de masas el grupo reportero se libera y en base a su intensidad se determina la abundancia relativa de cada péptido (Figura 7). Algunas de las ventajas de esta estrategia es que impide la pérdida potencial de muestra en todos los procesos previos al etiquetado ya que hay poca manipulación de la muestra; al combinar las muestras etiquetadas para el análisis en el MS si ocurriera alguna pérdida de

muestra durante el análisis, cada muestra experimentaría la misma pérdida y la proporción de los péptidos se conservaría, permitiendo el análisis de diferentes muestras simultáneamente. Adicionalmente se ha demostrado su compatibilidad con ensayos fosfoproteómicos [37, 75, 76]. Esta estrategia se ha aplicado a varios modelos biológicos, particularmente a la cascada de EGFr (del inglés, receptor del factor de crecimiento epidérmico) obteniéndose un perfil de 58 proteínas fosforiladas en 78 sitios (tirosinas) tras la estimulación con EGF. De las 58 proteínas identificadas en el análisis, 52 se han asociado con la cascada de señalización EGFr, mientras que las otras 6 proteínas no se habían identificado en análisis bioquímicos o proteómicos de la cascada EGFr [61].

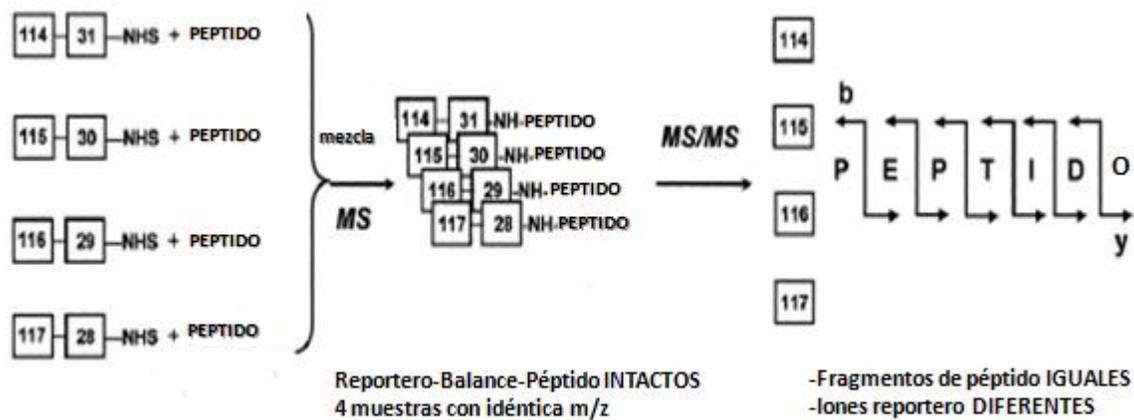


Figura 7. Esquema del etiquetado con iTRAQ. Breve descripción de los pasos a seguir para la identificación del perfil de fosforilación (Tomado de Ross, P.L., et al.[77]).

3. JUSTIFICACIÓN

Los rotavirus son el principal agente etiológico de gastroenteritis viral en niños. Anualmente causa 111 millones de episodios de gastroenteritis y alrededor de 600,000 muertes de infantes menores a 5 años. Alrededor del 82% de las muertes de infantes causadas por rotavirus suceden en países en vías de desarrollo[1].

Ya que la fosforilación tiene un papel importante durante la infección por rotavirus y no se han caracterizado completamente las fosfoproteínas involucradas [33-39]. Es de vital importancia una mejor comprensión de estos eventos de señalización, ya que nos permitirá tener una idea de las interacciones célula-rotavirus así como blancos potenciales para el desarrollo de nuevas terapias antivirales.

3.1 Hipótesis:

Se pueden determinar los cambios en el patrón de fosforilación de proteínas celulares inducidos por rotavirus utilizando una combinación de proteómica cuantitativa con purificación de fosfopéptidos.

3.1.1 Objetivo General:

Identificar los cambios inducidos en el fosfoproteoma de células MA104 tras la infección por rotavirus RRV.

3.1.2 Objetivos Particulares:

1. Determinar los tiempos de infección a analizar mediante western blot con anticuerpos contra fosfotirosinas.
2. Estandarizar las condiciones de extracción de proteínas, digestión y desalado de las muestras.
3. Estandarizar el inmunodot blot.
4. Estandarizar las condiciones de purificación de fosfopéptidos.
5. Estandarizar el etiquetado de las muestras con iTRAQ.
6. Identificación de los péptidos y proteínas.
7. Cuantificar las abundancias relativas.
8. Analizar las posibles interacciones (*in silico*).
9. Analizar los cambios en la fosforilación durante la infección.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Descripción general

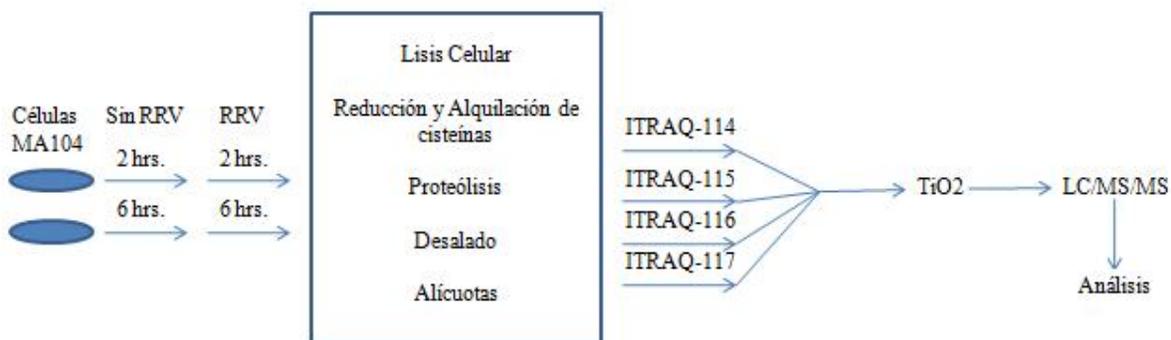


Figura 8. Estrategia experimental.

Las células MA104 se incubaron durante 2 y 6 horas en presencia o ausencia de Rotavirus (RRV) para posteriormente lisarlas y las proteínas de cada muestra digerir con tripsina y desalar. Etiquetar las alicuotas de cada muestra con los marcadores iTRAQ los cuáles se unen al extremo amino de los péptidos permitiendo compararlas cuantitativamente. Mezclar las muestras y purificar los fosfopéptidos mediante una columna de TiO_2 . Someter posteriormente al análisis por espectrometría de masas en el cual los péptidos etiquetados con las diferentes marcas iTRAQs co eluyen durante el gradiente LC y generan un único pico para cada carga en el scan MS. Al seleccionar un pico, la fragmentación del péptido etiquetado genera 4 picos con una m/z 114, 115, 116 y 117 que permiten determinar la abundancia relativa de cada condición. Posteriormente se analizaron los datos obtenidos para la determinación de la dinámica de fosforilación y la secuencia del péptido (**Figura 8**).

4.1.2 Líneas celulares y virus

Se empleó la línea celular MA-104 proveniente de células epiteliales de riñón de mono verde, las cuáles se crecieron en medio Advanced DMEM (GIBCO) suplementado con 4% suero fetal bovino (SFB) a 37°C /5% CO₂ y resembradas cada tercer día. La cepa de rotavirus de mono *Rhesus* RRV fue una donación de H. B. Greenberg de la Universidad de Stanford, California.

4.1.3 Ensayos de Infección

Las células MA104 se cultivaron hasta llegar a sub confluencia en placas de cultivo celular de 162 cm² en una incubadora con atmósfera húmeda a 37°C/5% CO₂. A las 24 horas se realizaron dos lavados con MEM (medio mínimo Gibco) para eliminar el suero y se dejaron en este medio durante 12 hrs/37°C/5% CO₂. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el medio e incubó con la cepa viral RRV a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 en 3 ml de MEM durante 1 hora a /37°C/ 5% CO₂ moviendo el medio cada 10 min. Posteriormente, el cultivo se lavó 2 veces con MEM y se dejó en 30 ml de MEM suplementado con aminoácidos no esenciales (AANE) 1X durante el tiempo de infección.

4.1.4 Lisis celular

Las células infectadas de cada placa se lavaron dos veces con PBS 1X frío y se lisaron con 5ml de RIPA (del inglés ensayo de radio inmunoprecipitación) frío (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 158 mM NaCl; 1 mM EGTA (etilenglicol del ácido tetracético); 1% Triton-X 100; 1% Deoxicolato; 0.1% SDS (dodecilsulfato sódico), 2 mM Molibdato; 1 mM DTT; 2 mM NaVO₄; 5 mM NaFl; 200 µl 50X de una pastilla Complete Protease Inhibitor Cocktail(Roche) disuelta en 1 ml de agua Milli Q (concentración final 2X). Para ello, se dejaron las placas de cultivo sobre hielo e incubaron durante 20 minutos con el buffer de

lisis RIPA. Después se cosechó el lisado con un gendarme y se centrifugó a 9,400 g durante 30 min a 4°C para eliminar los detritos celulares. Las muestras se pueden usar inmediatamente o almacenar a – 70°C.

4.1.5 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Se generó una curva de calibración usando BSA (albúmina sérica) como estándar. Se usó como concentración inicial de BSA 1000 ng/μl y final 31.25 ng/μl (dilución seriada doble).

Una vez realizado lo anterior, se preparó la solución de Bradford [78] en una dilución 1:5 en H₂O milli Q y se agregó 90 μl de esta solución por cada 10 μl de muestra de proteínas. Después se depositó en placas de 96 pozos e incubó 5 min para leer a 595 nm en un lector de placas.

4.1.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras se hirvieron a 95°C en presencia del buffer de Laemmli (5% SDS) [79] durante 5 min y se cargaron en un gel desnaturante SDS-poliacrilamida al 10% en amortiguador Tris-Glicina. Inicialmente las muestras se corrieron a 120 volts durante 5 min en el gel concentrador al 4% (2 ml de H₂O milli Q, 108 μl Tris 2 M pH 6.8, 330 μl de acrilamida-bis (30-0.08%), 25 μl de SDS 10 %, 25 μl de persulfato de amonio 10%, 3 μl de TEMED), posteriormente, se corrieron a 150 volts en el gel separador al 10% (1.9 ml de H₂O milli Q, 720 μl de Tris 2M pH 8.8, 1.33 ml de acrilamida-bis (30-0.08%), 36.5 μl de SDS 10%, 25 μl de persulfato de amonio 10%, 4 μl de TEMED).

4.1.7 Detección por Western Blot

El gel de proteínas se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA) a 130 mA durante 1 hr en amortiguador CAPS 10% (10 mM de ciclohexilamino-1-ácido

propansulfónico pH 11, 10% de metanol). Se verificó la transferencia de las proteínas mediante la tinción con rojo de Ponceau (0.1 % Ponceau en 5% de ácido acético). Posteriormente, la membrana se bloqueó con una solución al 5% de leche descremada (Carnation, México) en PBS-0.1% de Tween (PT) durante 1 hr en agitación a temperatura ambiente (TA). Al terminar el bloqueo, se incubó con el anticuerpo primario diluido 1:1000 en PT durante 1 hr en agitación a TA. Al finalizar la incubación, la membrana se lavó 3 veces con PT durante 10 min en agitación. Después, se incubó con el anticuerpo secundario ratón α -conejo acoplado a alexa 647 (Molecular Probes) diluido 1:10000 en PT si la lectura se realiza por fluorescencia, pero si se realiza por quimioluminiscencia, se diluye 1:3000 el anticuerpo cabra α -conejo peroxidasa o conejo α -raton peroxidasa. Incubar durante 1 hora en agitación a TA. Al término de la incubación, repetir los lavados y leer en el Typhoon a 670 nm (si es por fluorescencia) o revelar la membrana con el sustrato para la peroxidasa (Western Lightning) al exponer las películas fotográficas X-Omat (Kodak, Rochester, NY).

4.1.8 Tinción de Plata

El gel desnaturizante de proteínas se trató con una solución de fijación (15 ml de metanol, 3.6 ml de ácido acético, 15 μ l de formaldehído y 11 ml de H₂O milli Q) por 1 hr a T.A. o toda la noche a 4°C. Posteriormente, el gel se lavó tres veces durante 20 min cada uno (c/u) en agitación con 20 ml de etanol al 30% y se repitió el mismo procedimiento con 40 ml de H₂O. Una vez realizado los lavados, el gel se incubó con una solución de tiosulfato de sodio [0.01 gramos en 50 ml de H₂O (0.8 mM)] durante 1 min protegido de la luz y se guardaron 600 μ l de esta solución para su posterior uso. Después se realizaron 3 lavados con agua

durante 20 segundos c/u y se incubó con la solución de nitrato de plata (0.06 g de nitrato de plata, 22.5 µl de formaldehído en volumen final de 30 ml con H₂O milli Q) durante 20 min en agitación y se lavó 2 veces con agua por 20 segundos. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de revelado [1.8 gr de carbonato de sodio (0.56 M), 22.5 µl de formaldehído y 600 µl de tiosulfato de sodio 0.8 mM en volumen final de 30 ml de agua] El gel se lavó 2 veces con agua unos segundos y se detuvo la reacción con la solución de paro (15 ml de metanol, 3.6 ml de ácido acético y 11.4 ml de H₂O milli Q) durante 10 min en agitación. Posteriormente, se secó el gel o se guardó en una solución 50% metanol/50% agua.

4.1.9 Purificación de Fosfoproteínas

4.1.9.1 Purificación por el método de Qiagen

Los productos para la purificación de fosfoproteínas están diseñados para la purificación específica de proteínas fosforiladas de lisados celulares. Las proteínas que llevan un grupo fosfato en cualquier aminoácido se unen con alta especificidad a la resina de purificación de fosfoproteína mientras que las proteínas sin un grupo fosfato no se unen a la resina y por lo tanto se pueden encontrar en la fracción no unida.

La lisis celular se lleva a cabo usando un buffer de lisis que contiene el detergente zwitteriónico CHAPS a una concentración de 0.25% (w/v). Para evitar la formación de los complejos proteína-DNA, Benzonase (una DNAsa/RNAsa) se agrega al lisado. Para impedir degradación proteolítica del lisado, se agrega una mezcla de inhibidores de proteasa. Después de la lisis y un paso de centrifugación para limpiar el lisado, el contenido proteico de la muestra se determina y se ajusta a 0.1 mg/ml. Este ajuste en la concentración se realiza para asegurar que todos los grupos fosfato son fácilmente accesibles durante la purificación y no están ocultos dentro de complejos proteicos. Subsecuentemente, el lisado

se hace pasar a través de la columna y la fracción no unida a la columna que contiene la fracción de proteínas no fosforiladas se puede coleccionar. El lisado se deja pasar por gravedad a través de una resina de manera tal que las proteínas fosforiladas puedan unirse eficientemente. Después de un paso de lavado para remover cualquier proteína no fosforilada, las proteínas fosforiladas se eluyen en PBS. El fosfato presente en el PBS inhibe la actividad fosfatasa, y por lo tanto estabiliza el status de fosforilación de la fracción eluida durante los siguientes usos y almacenaje. El material de inicio para el proceso de purificación es 2.5 mg de proteína (0.1 mg/ml). Usualmente, entre el 7-15% de las proteínas provenientes de células crecidas en condiciones estándar (por ejemplo, sin inducir la fosforilación) pueden llevar uno o más grupos fosfatos. Por lo tanto, la producción esperada de una columna de purificación de fosfoproteínas es de 175-375 μg de proteína fosforilada. La máxima capacidad de unión de la columna es de 500 μg de proteína fosforilada.

4.1.9.2 Purificación de fosfoproteínas por el método en batch

Lisis y preparación del Fe^{2+} -IMAC

Las células previamente crecidas e infectadas, se lisaron con 3ml del buffer de lisis (1% de tritón X100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH8, inhibidor de proteasa [Roche EDTA-free]).

Inicialmente se saturó la agarosa NTA (Qiagen, No. Catalogo 1018244) con FeCl_3 . Para ello, las perlas de NTA se incubaron con 3 volúmenes de 0.1 M FeCl_3 en 0.1 M de ácido Acético por 16 horas a temperatura ambiente. Después, las perlas se lavaron con 5 volúmenes de 0.1 M de ácido acético y se almacenaron en este buffer. Antes de su uso, las perlas se lavaron con 5 volúmenes del buffer de lisis e incubaron con el lisado durante 12

horas (3 ml de lisado para 2 ml de perlas Fe-IMAC; en promedio, 2.5 mg de proteínas en 3 ml de lisado) a una concentración de 0.1 mg/ml (diluir los 2.5 mg de proteínas en 25 ml volumen final de buffer de lisis). Después de incubar, las perlas se lavaron 6 veces con buffer de lavado (5 mM Tris/HCl, pH 6.3, 150 mM NaCl) y se eluyeron las proteínas unidas incubando las perlas con el buffer de elución (50 mM K₂HPO₄, 50 mM de NaCl, pH 7.5. Filtrar antes de usar) durante 5 min a 95°C. Este paso se repitió tres veces. Posteriormente, se tomó una alícuota del lisado, lavado y de las eluciones para analizar la eficiencia de la purificación (34).

4.2 Precipitación con acetona

Enfriar la acetona a -20°C y agregar 6 volúmenes al tubo con la muestra e invertir 3 veces. Posteriormente, incubar el tubo a -20°C hasta que un precipitado se forma (durante 4 horas) y centrifugar 5 minutos a 5000 RPM (97g). Decantar la acetona y procurar no dejar secar la pastilla, la cual se resuspende en H₂O milli Q y se cuantifica la proteína por Bradford [78].

4.3 Extracción de péptidos mediante digestión en gel

Los reactivos se prepararon en el momento de la extracción. A) Solución de destinción: 50% de metanol/5% de ácido acético en agua milli Q; B) solución 10mM DTT: 1.5mg/ml en 100 mM de ABC (bicarbonato de amonio) o TEAB (bicarbonato de trietilamonio); C) solución 50 mM de iodoacetamida: 10 mg/ml en 100 mM de ABC o TEAB; D) solución de tripsina (en hielo): 20 ng/μl Promega sequencing grade modified trypsin (No. Cat: V5111) en 50mM de ABC o TEAB; E) solución de extracción: 5% de ác. Fórmico en 50% acetonitrilo

Procedimiento:

Día 1

Se disolvieron 2.5 mg de las proteínas precipitadas en buffer de Laemly (5% SDS) [79] y se corrió en un gel desnaturalizante SDS-poliacrilamida al 10% de un solo carril. Posteriormente, se tiñó el gel durante 20 minutos con coomassie y se destiñó durante toda la noche con una solución 40% metanol/10% ácido acético. El gel que contiene la proteína se cortó y se dividió en pequeños fragmentos de manera tal que no se puedan introducir en las puntas de las pipetas. Posteriormente, los fragmentos se destiñeron en 500 μ l de solución de destinción.

Día 2

La solución de destinción se removió y se reemplazó con 200 μ l de nueva solución de destinción e incubó 2-3 hrs. La solución de destinción se desechó y se deshidrató los geles en 200 μ l de 100% acetonitrilo. El gel se tornara blanquecino en 5 min. De no ser así, quitar el acetonitrilo y volver a agregar 200 μ l de acetonitrilo. Posteriormente, se desechó el acetonitrilo y se secó en un speedvac 2-3 min para desechar el acetonitrilo restante.

Las proteínas se redujeron en 30-50 μ l 10 mM de DTT por 30 min a TA. El DTT se removió y la muestra se alquiló en 30-50 μ l mM de iodoacetamida por 30 min a TA protegido de la luz. Luego, la solución de iodoacetamida se removió y se lavó con 100 μ l de 100 mM de bicarbonato de amonio por 10 min. Posteriormente, el bicarbonato se removió y se deshidrató el gel con 200 μ l de acetonitrilo. Las piezas se tornaran blanquecinas en 5 min, si no pasa, quitar la solución y agregar más acetonitrilo.

El acetonitrilo se removió y se rehidrató el gel en 100 μ l de 100mM ABC por 10 min. Después, se removió el ABC y se volvió a deshidratar en 200 μ l de acetonitrilo. El acetonitrilo se quitó y volvió a agregar 200 μ l de acetonitrilo. Finalmente, el acetonitrilo se quitó y se secó en un SpeedVac 2-3 min.

Se preparó la solución de tripsina (Promega) 20 ng/ μ l en 50 mM de ABC y se mantuvo en hielo. Después la solución de tripsina se agregó a los geles y se esperó 5-10 min hasta que se rehidrataran (la tripsina entra en el gel para que pueda actuar). El exceso de tripsina se removió y se agregó la solución 50 mM de ABC hasta que los geles quedaron cubiertos. Posteriormente se dejó toda la noche a 37 °C.

Día 3

Se agregó 100 mM ABC hasta que el gel quedó cubierto y se vortexeó e incubó 10 min. Después se centrifugó y tomó el sobrenadante en un tubo. Los péptidos se extrajeron con la solución de extracción (que cubra el gel) e incubó por 10 min. El extracto se depositó en el tubo anterior. El paso anterior se repitió y por último se evaporó la muestra hasta un volumen de 20 μ l (no secar).

4.4 Extracción de péptidos mediante digestión en solución

Se tomó una muestra de las proteínas precipitadas con acetona y se secaron en el SpeedVac. Luego la muestra se resuspendió en 100 μ l de bicarbonato de trietilamonio 50 mM pH 8.5 y se redujo agregando 5 μ l de DTT 200mM (30.86 mg of DTT + 1000 μ l of 100mM bicarbonato de trietilamonio). Posteriormente se centrifugó un par de segundos y se dejó incubando entre 45 min a 1 hr a TA. Después se procedió a alquilar la muestra agregando 4 μ l de 1 M iodoacetamida en 100 mM de bicarbonato de trietilamonio. Después se mezcló

centrifugó e incubó protegido de la luz durante 45 min a 1 h. La alquilación se detuvo agregando 20 μ l 200 mM DTT mezclando y centrifugando. La muestra se dejó incubando entre 45 min a 1 hr protegido de la luz. Posteriormente se le agregó tripsina (Promega sequencing grade modified trypsin) en una proporción 1:50 con respecto a la masa de proteína a digerir disuelta en 50 mM de bicarbonato de trietilamonio pH 8.5 y se incubó a 37°C durante al menos 22 hrs. Al día siguiente se detuvo la digestión acidificándola al 0.4% TFA (ácido trifluoroacético) y se desaló empleando columnas C18.

4.4.1 Desalado mediante columnas C18

Para llevar a cabo el desalado de las muestras, se realizaron usando cartuchos Sep-Pak tC18 (No. Cat: WAT054960). Cada cartucho tiene la capacidad de desalar 2.5 mg de péptidos. Inicialmente se activaron los cartuchos realizando 3 lavados de 1 ml cada uno con acetonitrilo al 100%. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 1 ml cada uno con 50% acetonitrilo/0.5% ácido acético en agua miliQ y 3 lavados de 1 ml con una solución 0.1% TFA en agua miliQ. Después de esto la digestión se virtió sobre el cartucho y se dejó que pasara por la columna. Se realizaron 3 lavados de 1 ml cada uno con 0.1% TFA y luego se lavaron con 0.5 ml 0.5% de ácido acético en agua miliQ. Los péptidos se eluyeron con 1 ml 50% acetonitrilo/0.5% ácido acético. Los péptidos eluidos se secaron en un SpeedVac y se guardaron a -70°C.

4.4.2 Cuantificación de péptidos

Los péptidos digeridos y desalados se cuantificaron midiendo las absorbancias a tres longitudes de onda: 205 nm, 215 nm y 225 nm y los valores obtenidos se introdujeron en dos formulas: $(205) \times 31 = \text{ug/ml}$ y $(215-225) \times 144 = \text{ug/ml}$. Dichos valores se promediaron.

4.5 Purificación de fosopéptidos empleando columnas IMAC-Galio (Thermo Scientific Pierce Ga-IDA Phosphopeptide Enrichment Kit No Cat: 89853)

Las columnas tienen una capacidad de retención de 150 µg de péptidos fosforilados. A partir de la digestión de péptidos desalados, se mezclaron en igual proporción (volumen/volumen) con el buffer de unión (5% de ácido acético, pH<3) y se agregaron 25-50 µl de la mezcla a la columna e incubó durante 3-5 min a T.A. y mezcló cada 2 min mediante un ligero golpe en la punta. El tapon se quitó de la punta de la columna y se depositó en un tubo de centrifuga. Posteriormente, se centrifugó a 1000 x g durante un minuto y se depositó en otro tubo. Enseguida se agregó 50 µl de buffer de lavado 1(0.1% de ácido acético) para remover los péptidos no unidos y se golpeó ligeramente la punta. Se centrifugó a 1000 x g durante 1 min y se repitió el procedimiento de lavado. Después, se agregó 50 µl de buffer de lavado 2 (0.1% de ácido acético/10% de acetonitrilo pH 3) para despegar los péptidos no fosforilados y se golpeó ligeramente la punta. Se centrifugó a 1000 x g durante 1 min y se repitió el segundo lavado. Luego la columna se transfirió a otro tubo y agregó 75 µl de H₂O milli Q para equilibrar. Se golpeó ligeramente la punta y se centrifugó a 1000 x g durante 1 min. Se transfirió a otro tubo y agregó 20 µl del buffer de elución (0.1 M de bicarbonato de amonio, pH 9) e incubó durante 3-5 min a TA. Finalmente, se centrifugó a 1000 x g durante 1 min y se repitió la elución.

4.6 Purificación de fosopéptidos empleando columnas de óxido de titanio (Protea Bioscience TiO₂ SpinTips Sample Prep Kit No Cat: SP-154-24)

Las columnas funcionan eficientemente con 500 µg de péptidos trípticos desalados. Inicialmente se aseguró que toda la resina de titanio estuviera en el fondo de la punta y después se equilibró la columna agregando 100 µl de la solución de reconstitución y lavado para centrifugar a 4000 x g/5min. Este procedimiento se repitió. La muestra, previamente

digerida y secada, se resuspendió con 600 μ l de solución de reconstitución y lavado (puede usar lo que sobra de equilibrar la columna) y se agregó en ciclos de 200 μ l centrifugando a 4000 x $g/3$ min. Esto se repitió 4 veces. Posteriormente la columna se lavó con 100 μ l de la solución de reconstitución y lavado y se centrifugó a 4000 x $g/3$ min, repitiendo de nuevo el lavado y la centrifugación. Luego se lavó con 100 μ l de la solución de lavado 2 y se centrifugó a 4000 x $g/3$ min e igualmente se repitió el segundo lavado y centrifugación. Finalmente se transfirió la columna a un tubo nuevo de 2 ml y se eluyó 2 veces cada una con 200 μ l de la solución de elución a 4000 x $g/3$ min.

4.7 Inmunodot blot

La membrana de nitrocelulosa se sumergió en una solución al 1% de glutaraldehído en agua milli Q e incubó por 10 min a TA. Se dejó secar sobre una pieza de papel filtro hasta que no se observó húmedo. Por otro lado, la muestra de péptidos se secó y resuspendió en 0.1% de ácido fórmico colocando 1 μ l sobre la membrana de nitrocelulosa y se dejó secar por al menos 40 min. Para revelar la membrana se realizó de igual forma que en el western blot, excepto que la membrana se bloqueó con 5% BSA en TBS-Tween (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.1% (v/v) Tween-20) y los lavados se realizaron por 5 min [80].

4.8 Espectrometría de masas

La muestra se analizó por electrospray en un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL de la compañía Thermo. Se tomo una alícuota de la muestra de fosfopéptidos en un ZipTip (Millipore No. Cat: ZTC18S096) y se inyectó en una columna de cromatografía líquida. El equipo se programó para que el análisis durara 120 min, durante el cual se tomaron los dos

iones más intensos. Dichos iones inicialmente se fragmentaban por HCD (del inglés, High Collision Dissociation) para detectar las etiquetas iTRAQ. Posteriormente, se fragmentaban por CID (del inglés, Collision Induced Dissociation) para obtener la secuencia del péptido. Si se observaba pérdida neutral de grupos fosfato, significaba que ese péptido estaba fosforilado y se le aplicaba de nuevo la fragmentación CID. Para que la secuenciación fuera completa (detalles del método de fragmentación, ver en apéndice).

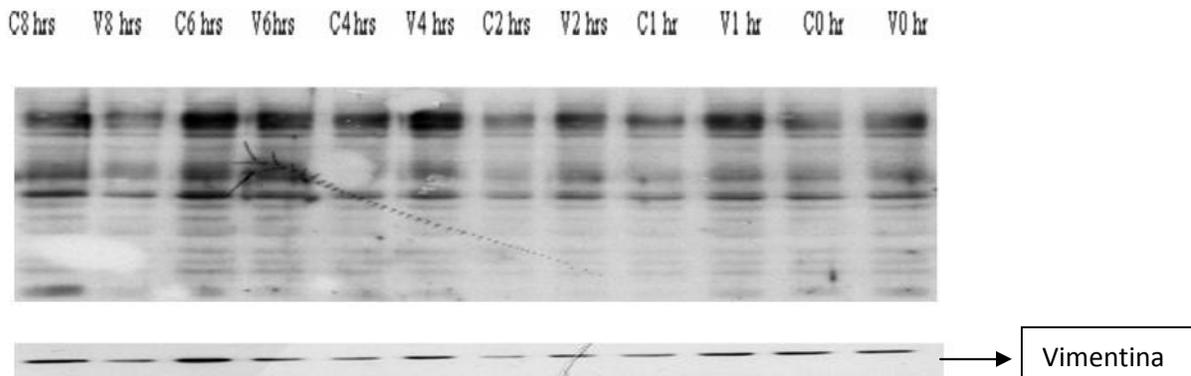
5. Resultados

5.1 Cinéticas de infección de MA104 y Caco

Con el propósito de determinar un punto durante la infección en el cual se pudieran observar cambios evidentes en el patrón de fosforilación para establecer esos tiempos a analizar. Se realizaron cinéticas de infección de 8 y 12 horas en las células MA104 y Caco-2 respectivamente, infectadas a una MOI (multiplicidad de infección) de 10 con la cepa de rotavirus RRV (**Figuras 9 y 10**).

Al analizar el western blot de la Figura 9 A) y 10 A) que corresponden a la cinética de MA104 y Caco-2 respectivamente, no se observa que en geles de una dimensión haya cambios diferenciales en el patrón de fosforilación al comparar con el control sin infectar. Y como control de que las células realmente están infectadas se realizaron western blot contra las proteínas virales de rotavirus observándose que estas aumentan conforme avanza el tiempo de infección [Figura 9 B) y 10 B)]. Como no se pudo determinar mediante western blot un tiempo donde hubieran cambios en la fosforilación, se decidió hacer uso de los tiempos reportados en la literatura en la cual se activan las cinasas durante la infección, los cuales ocurren principalmente entre las 2 y 6 horas post infección, los cuales son relevantes ya que nos interesan aquellos tiempos similares a los del inicio de la transcripción viral así como eventos tardíos durante la traducción [39, 42-45, 81, 82].

A)



B)

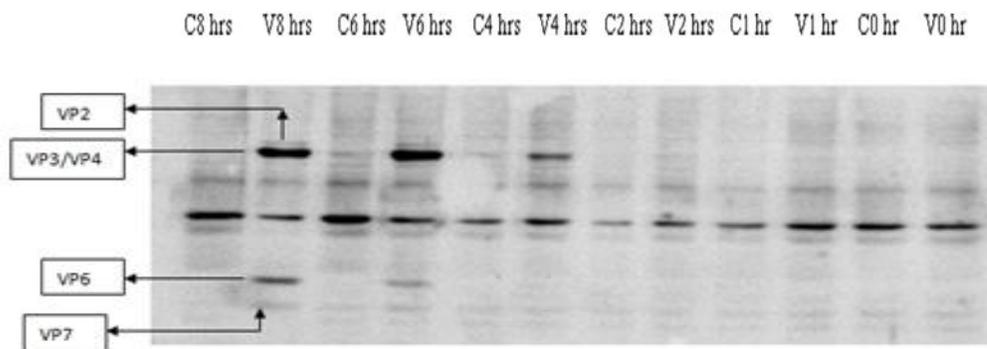
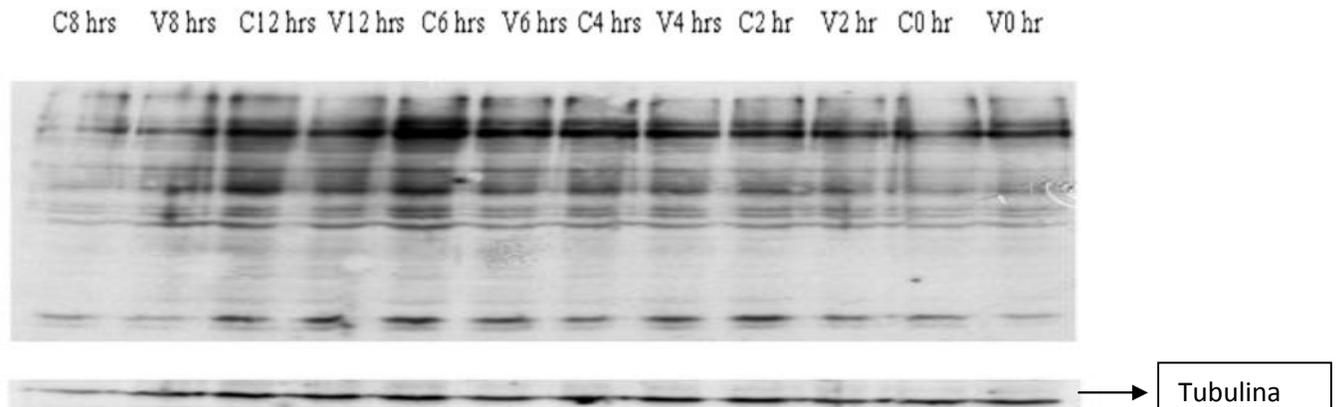


Figura 9. Western blot anti fosfotirosinas de una cinética de 8 horas en células MA104. En A) se muestra western blot anti fosfotirosinas de una cinética de 8 horas donde se comparan células control (C) contra células infectadas con rotavirus (V) cepa RRV a una MOI de 10, como control de carga se utilizó vimentina. En B) se muestra western blot contra proteínas virales como control de infección en células control (C) e infectadas (V) usando el anticuerpo anti TLP's.

A)



B)



Figura 10. Western blot de una cinética de 12 horas en células Caco-2. En A) se muestra western blot anti fosfotirosinas de una cinética de 12 horas donde se comparan células control sin infectar (C) y células infectadas con rotavirus (V) cepa RRV a una MOI de 10, como control de carga se utilizó tubulina. En B) se muestra western blot contra proteínas virales como control de infección en células control (C) e infectadas (V) usando el anticuerpo anti TLP's.

5.2 Purificación de Fosfoproteínas

Inicialmente se plantearon dos estrategias para la purificación de fosfopéptidos, primero generar una muestra menos compleja enriqueciendo fosfoproteínas y a partir de ellas los fosfopéptidos. La segunda estrategia consiste en purificar directamente los fosfopéptidos a partir de la mezcla compleja.

Como prueba inicial empleando la primera estrategia se enriquecieron fosfoproteínas a partir de ensayos de infección de 2 horas con columnas de Qiagen siguiendo las indicaciones del distribuidor. Al cosechar el cultivo celular previamente crecido e infectado, se obtuvo una concentración de proteínas como se muestra:

2 horas de Infección	Concentración Final Proteína mg/ml
Control	1.2362 (6.181 mg totales)
Virus	1.0602 (5.31 mg totales)

Posteriormente, se determinó la eficiencia de la purificación de fosfoproteínas mediante la detección de fosfotirosinas por western blot como se muestra en la **Figura 11**. Se cargaron 3 µg de muestra en cada carril y al analizar la membrana se observó que no se detecta señal en los lavados y ligeramente en la fracción no unida que principalmente es proteína no fosforilada. La mayor señal proviene de los lisados celulares sin purificar y de las eluciones. Sin embargo al comparar estas muestras se observó que las bandas de alto peso molecular se enriquecen ligeramente en las eluciones de células control sin infectar e

infectadas (E3 y E4), mientras que bandas de peso molecular bajo presentes en la fracción no enriquecida se dejan de observar en las fracciones enriquecidas de las eluciones E3 y E4. Estos resultados parecen indicar que la purificación de fosfoproteínas mediante las columnas de Qiagen no fue muy eficiente por lo que se decidió evaluar otros métodos de purificación.

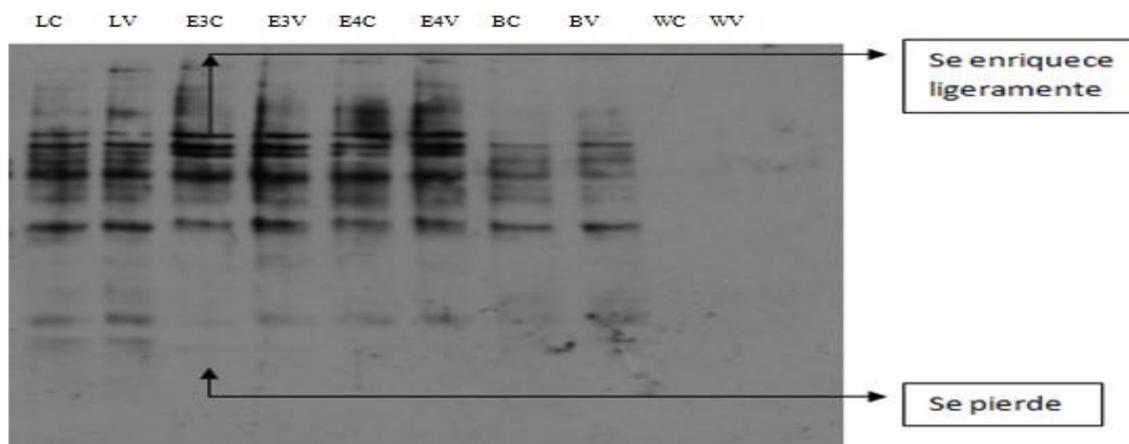


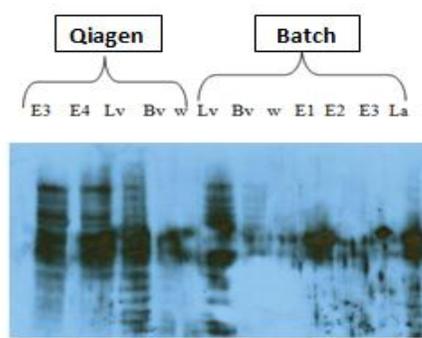
Figura 11. Purificación de fosfoproteínas a partir de células MA104 infectadas 2 horas mediante columnas de Qiagen. En esta figura se muestra un western blot anti fosfotirosinas. Para realizar este ensayo se cargaron 3 μ g de proteínas del lisado control (LC), lisado viral (LV) y de las eluciones (E3C, E3V, E4C, E4V). BC (no unido del control), BV (no unido viral), WC (lavado del control), WV (lavado viral).

5.3 Purificación de fosfoproteínas por el método en “batch”

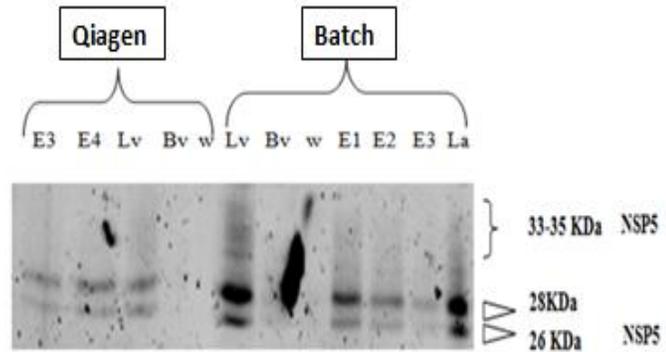
Como la purificación de fosfoproteínas empleando el método anterior no fue tan eficiente como habíamos observado en la literatura en la cual se enriquece hasta 10 veces la muestra fosforilada [54], decidimos emplear un protocolo diferente de purificación que al igual que el anterior es IMAC pero realizado en batch o lote, ya que se ha reportado con este método eficiencias de hasta el 90% [55]. Los resultados de purificación en batch se compararon con los de Qiagen para determinar la eficiencia del método así como bandas diferenciales que pudieran observarse entre ellas. Como control de carga se realizó tinción de plata.

Para comparar los métodos de enriquecimiento de fosfoproteínas se realizaron western blot anti fosfotirosinas de cada una de las fracciones obtenidas en cada paso **[Figura 12 A)]**. En esta figura se observa un enriquecimiento de fosfotirosinas en las fracciones eluidas con las columnas de Qiagen (E3 y E4) cuando se compara con el lisado total como control. Por otro lado, cuando se analizan las fracciones eluidas mediante IMAC batch no se observa un enriquecimiento de fosfotirosinas. Cuando analizamos el control de carga **[Figura 12B)]** se observa que la cantidad de proteína en las fracciones eluidas mediante la técnica en batch es menor con respecto a su control (lisado total) e incluso comparado con las fracciones eluidas mediante las columnas de Qiagen, lo cual pudiera explicar en parte el menor enriquecimiento de fosfotirosinas en batch. Como control de enriquecimiento de fosfoproteínas se analizó NSP5 **[Figura 12 C)]** la cual es una proteína viral que se sintetiza desde las dos horas y que se sabe se hiper fosforila durante la infección [20, 21, 83]. Se observa un mayor enriquecimiento en las fracciones eluidas por batch al comparar con las fracciones de Qiagen. Como control de que nuestro método de elución estaba funcionando correctamente, decidimos lavar la resina del IMAC batch con Laemly para que todo aquello que se hubiese quedado en la resina se lograra despegar. Cuando se observa la fracción eluida con Laemly, esta tiene una mayor señal lo cual sugiere que probablemente no se estaban eluyendo eficientemente las fosfoproteínas y quizá por ello la recuperación de fosfoproteínas reflejado en los western blot no es la adecuada. En base a estos resultados, se optó por otra estrategia que nos permitiera la purificación de fosfopéptidos.

A)



C)



B)

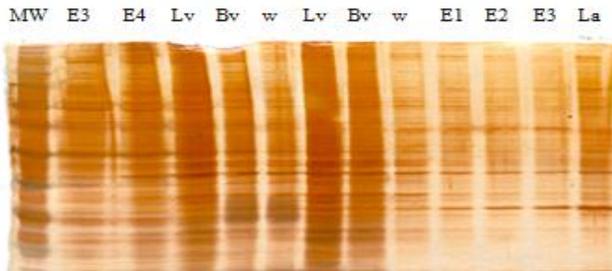


Figura 12. Comparación de la purificación de fosfoproteínas mediante el método en batch y Qiagen. Este ensayo se realizó a partir de muestras provenientes de células MA104 infectadas 6 horas y se cargaron 3 μ g de proteínas de las eluciones y de los lisados. MW (marcador de peso molecular), Lisado viral (LV), BV (no unido viral), w (lavado), E1-E4 (eluciones). El último carril corresponde a la elución con **Laemmli** (La) para despegar todas las fosfoproteínas unidas a las perlas en el ensayo en batch. En A) se compara la purificación de fosfotirosinas mediante western blot del método en batch y Qiagen. En B) se muestra la tinción de plata como control de carga de A) y C). En C) se compara la purificación de la fosfoproteína viral NSP5 por ambos métodos.

5.4 Purificación y detección de Fosfopéptidos

5.4.1 IMAC

Una de las estrategias para la purificación de fosfopéptidos a partir de mezclas complejas es el uso de columnas IMAC [32, 46, 54, 62, 65]. Por ello se usaron columnas de IMAC-galio y para determinar si estas tenían la capacidad de unir fosfopéptidos, se usaron como control fosfopéptidos sintéticos de diez residuos de aminoácidos con fosforilaciones en serina, treonina y tirosina. Al mezclar dichos fosfopéptidos con péptidos obtenidos de secreciones de piel de rana que no están fosforiladas y hacerlos pasar por la columna de IMAC-galio, se observó que las columnas tenían la capacidad de unir los fosfopéptidos, ya que al pasar por cromatografía líquida acoplado al espectrómetro de masas se observaban dichos fosfopéptidos con tiempos de retención de 19.2 y 19.6 min (ver mas adelante).

5.4.2 Ensayo de purificación de fosfopéptidos mediante columnas IMAC-Galio

Para realizar la purificación, se realizó una digestión en solución de muestras provenientes de ensayos de infección de 6 horas en células MA104. Sin embargo, al analizar las muestras digeridas en el espectrómetro de masas por inyección directa, no se observó la digestión de las muestras ya que solo se observaron picos discretos característicos de ruido de fondo (**Figura 13**). Ante este panorama para poder avanzar en la purificación de fosfopéptidos, se decidió digerir las muestras en gel ya que esta técnica ya estaba montada en el laboratorio mientras en paralelo se determinaba las condiciones adecuadas para llevar a cabo las digestiones en solución las cuales son mucho más rápidas y con mucho menor manipulación de la muestra.

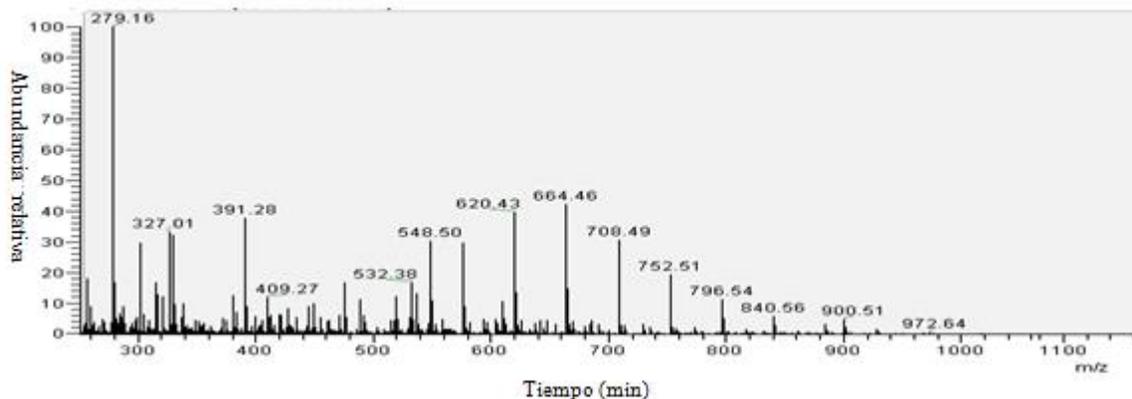


Figura 13. Patrón de fragmentación de una muestra digerida en solución. Se analizaron 5 μg de péptidos provenientes de células MA104 infectadas con RRV por inyección directa en el espectrómetro de masas.

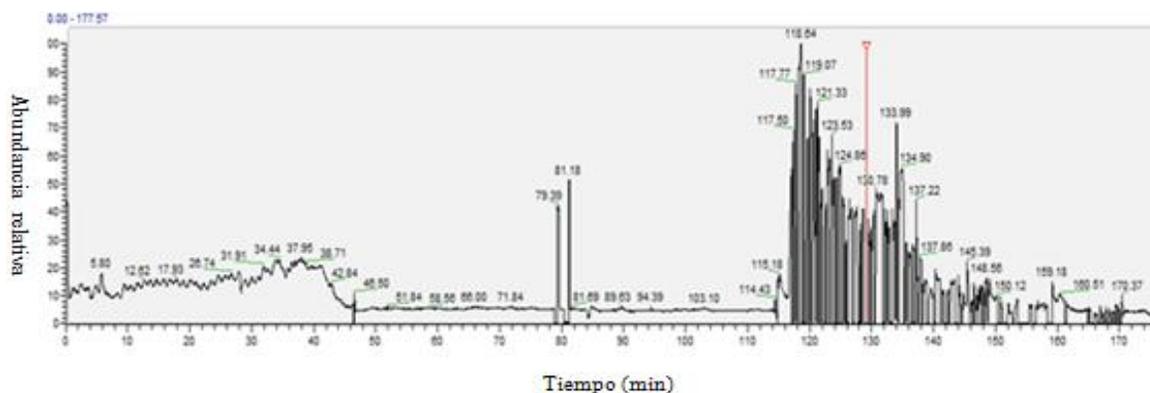
Se realizó una digestión en gel de 1.5 mg de proteínas provenientes de MA104 con Lys C. La mitad de la muestra se analizó directamente en el espectrómetro de masas y la otra mitad se hizo pasar previamente por columnas de galio antes de analizar (**Figuras 14 y 15**).

Como se observa en la **Figura 14 A)** la digestión en gel funciona ya que se observa la fragmentación de los péptidos. Y no se hallaron péptidos fosforilados como se esperaría de una mezcla compleja sin enriquecer, ya que los péptidos fosforilados son mucho menos abundantes y no se ionizan tan bien como los péptidos no fosforilados [**Figura 14 B)**].

Posteriormente, se decidió pasar por columnas de galio 750 μg de péptidos provenientes de MA104 y se observó una buena digestión de la muestra ya que la intensidad de los péptidos es alta y empiezan a eluir desde tiempos tempranos [**Figura 15 A)**]. Sin embargo, solo se identifican 30 proteínas de las cuáles solo el 30% estaban fosforiladas [**Figura 15 B)**]. Estudios previos demuestran que la eficiencia de la columna IMAC (alrededor del 75%) se aumenta significativamente hasta en un 90% [32, 37, 46, 54, 62] si se acopla a otra técnica de purificación como columnas de dióxido de titanio o de intercambio catiónico

fuerte. En base a esto, se decidió purificar los fosfopéptidos empleando columnas de dióxido de titanio.

A)



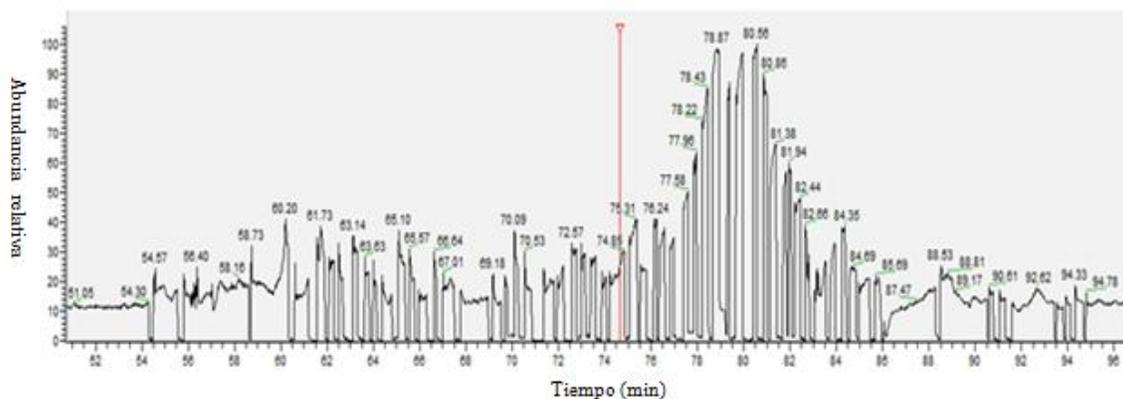
B)

Accession #	Coverage	Peptides	#AAs	Description
4501889	4.26%	41	376	Actin, gamma 2 propeptide
31542947	5.06%	43	573	Chaperonin
24234688	5.89%	43	679	Heat shock 70kDa protein 98 precursor
4503483	2.8%	22	858	Eukaryotic translation elongation factor 2
17921991	4.31%	25	418	Tubulin, alpha 2 isoform 2
12667788	2.76%	26	1960	Myosin, heavy polypeptide 9

Figura 14. Identificación de proteínas no fosforiladas a partir de una muestra de MA104 sin purificar. En A) en la parte superior se muestra el cromatograma de la digestión de 750 µg de proteínas. En la parte inferior se muestra como ejemplo el patrón de fragmentación de un péptido. En B) Se representa algunas de las proteínas halladas de esa digestión [Accession # (muestra el identificador de la proteína), Coverage (muestra el porcentaje de cobertura de la secuencia proteica en base a los péptidos hallados), # Peptides

(muestra el número total de péptidos hallados para esa proteína), # AAs (muestra el número de aminoácidos de la proteína), Description (muestra el nombre la proteína)].

A)



B)

Accession #	Coverage	Peptides	#AAs	Description
20149594	2.35%	12	724	Heat shock 90kDa protein 1, beta
24308169	0.97%	12	4116	Dynein, axonemal, heavy polypeptide 3
21361722	1.11%	15	1805	Kinesin family member 13A
4506945	1.2%	10	1827	Sucrase isomaltase (alpha glucosidase)
71061468	0.96%	58	2701	Centromere protein E
4503571	2.76%	19	434	Enolase 1
4826878	4.74%	7	527	Oxidative-stress responsive

Figura 15. Identificación de fosfoproteínas provenientes de células MA104 purificadas por columnas de galio. En **A)** se muestra el cromatograma de los péptidos pasados por la columna. En **B)** se representan las proteínas halladas [Accession # (muestra el identificador de la proteína), Coverage (muestra el porcentaje de cobertura de la secuencia proteica en base a los péptidos hallados), # Peptides (muestra el número total de péptidos hallados para esa proteína), # AAs (muestra el número de aminoácidos de la proteína), Description (muestra el nombre la proteína)].

5.4.3 Dot-Blot

Con la finalidad de tener un método que nos permitiera detectar si el paso previo de purificación funcionaba eficientemente, se decidió emplear el dot blot como punto de control de calidad de las muestras [80]. Recientemente se ha descrito el uso del inmuno-dot blot para la detección de fosfopéptidos. Este método permite determinar la calidad de la muestra enriquecida antes de enviar a analizar por espectrometría de masas y no se necesita de un equipo especializado para llevarla a cabo. Además que permite detectar selectivamente péptidos fosforilados en serina, treonina o tirosina.

Por otro lado, para determinar si las muestras provenientes de MA104 están fosforiladas en un grado tal que puedan detectarse eficientemente, los resultados se compararon con ensayos realizados en células HeLa. Ya que esta línea celular se ha empleado en diversos estudios de fosfoproteómica [66, 84, 85].

Inicialmente se estandarizó el protocolo para realizar el inmunodot blot y se realizó como se describe en materiales y métodos (**Figura 16**).

En la **Figura 16 A**) se demuestra que el inmunodot blot está funcionando así como la especificidad de los anticuerpos ya que se detecta señal de la mezcla de fosfopéptidos sintéticos y no se detectan los péptidos de secreción de piel de rana no fosforilados que funcionan como control negativo. Asimismo, se muestra que la forma en que se procesan las muestras no interfiere con la señal de los fosfopéptidos sintéticos cuando se mezclan.

Posteriormente se determinó si por un inmunodot blot podíamos detectar fosfopéptidos a partir de una muestra de células HeLa sin enriquecer [**Figura 16 B**)]. Los resultados

señalan que es posible detectar fosforilación a partir de una muestra compleja en células HeLa.

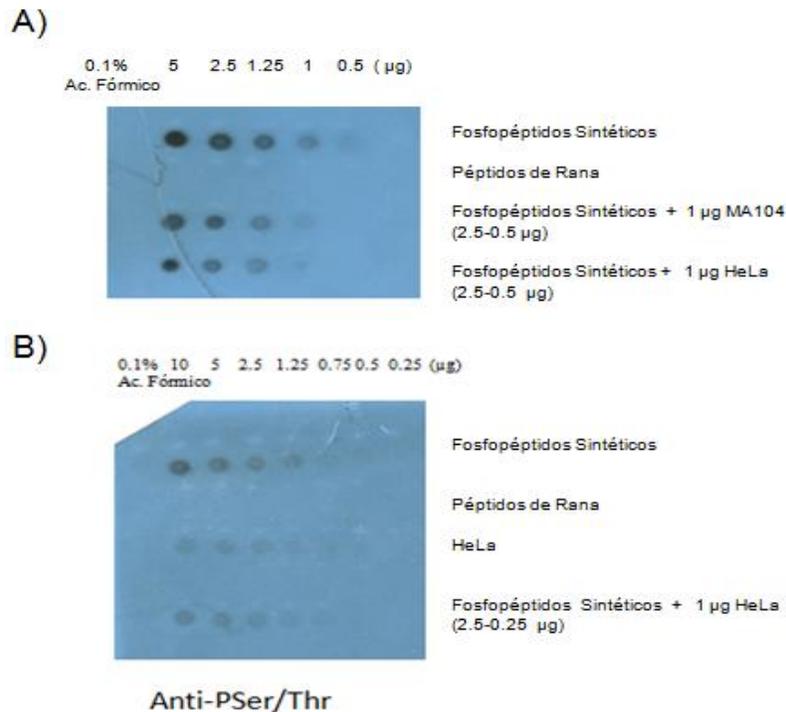


Figura 16. Estandarización del Inmunodot blot. En A) y B) se muestra el inmuno dot blot anti-Phospho Ser/Thr de muestras provenientes de células HeLa. Como control positivo se usó una mezcla de péptidos sintéticos fosforilados en serina, treonina y tirosina. Como control negativo se usaron péptidos de rana no fosforilados así como el buffer de resuspensión de los péptidos (0.1% ácido fórmico). En A) se colocaron desde 0.5 μg hasta 5 μg de fosfopéptidos sintéticos, estas mismas cantidades se colocaron para los péptidos de rana. Para determinar si el método de procesamiento de muestras interfiere con la detección de los fosfopéptidos sintéticos (0.5 μg hasta 2.5 μg), se agregaron 1 μg de péptidos provenientes de MA104 y HeLa independientemente. En B) se colocaron desde 0.25 μg hasta 10 μg de fosfopéptidos sintéticos, péptidos de rana y péptidos totales de HeLa. Además se colocaron desde 0.25 μg hasta 2.5 μg de fosfopéptidos sintéticos mezclados con 1 μg de péptidos provenientes de células HeLa.

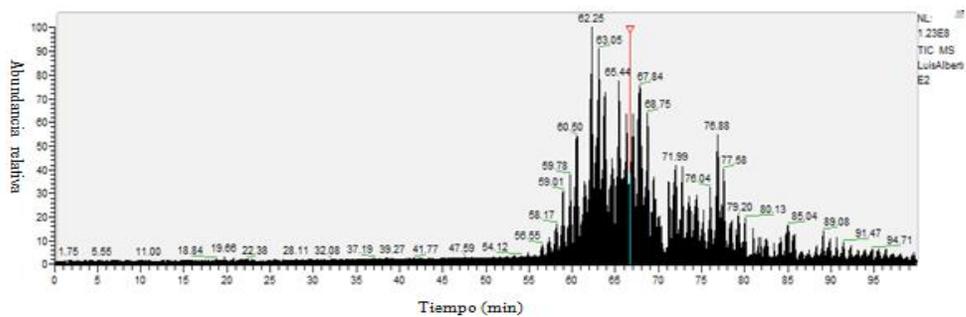
5.4.4 Purificación de fosfopéptidos empleando columnas de TiO₂

Una de las estrategias para la purificación de fosfopéptidos es mediante el empleo de columnas de dióxido de titanio, las cuales se ha visto que tienen una mayor afinidad y son más eficientes que las columnas IMAC [64]. Con la finalidad de determinar cuál columna funcionaba mejor en nuestras condiciones y si al combinarlas se mejoraba la purificación, se hicieron pasar 2 mg de proteínas de células HeLa no infectadas digeridas en gel por las columnas de óxido de titanio y posteriormente el eluido de ésta se secó y se resuspendió en las soluciones de la columna de galio para pasarla por ella. Como se observa en la **Figura 17 A**), la mayor señal de los fosfopéptidos proviene de la muestra eluida de la columna de titanio, aparentemente la columna de galio no funcionó, ya que, la mayor señal se observa en el no unido a la columna. Como el inmunodot blot sugiere que hubo enriquecimiento de fosfopéptidos, se inyectaron 5 µg de las muestras pasadas por titanio al espectrómetro de masas [**Figura 17 B**) y **C**)] y se detectaron 198 proteínas de las cuáles el 48% presentan fosforilación. De igual forma, se hizo una digestión en gel de 2 mg de proteína proveniente de MA104 y se enriqueció usando columnas de titanio. El 37% de las proteínas halladas estaban fosforiladas (datos no mostrados), por lo cual decidimos usar estas columnas para los posteriores ensayos.

A)



B)



C)

Resumen de la purificación por TiO ₂
❖ Se generaron 2600 espectros de fragmentación
❖ Identificamos 1178 péptidos
❖ Se identificaron 562 péptidos con múltiples sitios de fosforilación
❖ 198 proteínas totales
❖ 95 proteínas estaban fosforiladas
❖ Corroborado por otro buscador (MASCOT)

Figura 17. Purificación de fosfopéptidos provenientes de células HeLa mediante columnas de TiO₂. En **A)** se muestra el inmunodot blot anti-fosfotirosina de muestras enriquecida por TiO₂ y Galio. De cada condición, se colocaron 2.5 y 0.5 µg de péptidos respectivamente. En **B)** se muestra el cromatograma de la muestra inyectada en el

espectrómetro de masas y en C) una tabla con el resumen de datos generados mediante el buscador Sequest.

5.4.5 Digestión en solución

Para hacer el proceso más eficiente se realizó la digestión en solución como se describe en la metodología, ya que esto evita la pérdida de muestra durante el proceso (**Figura 18**).

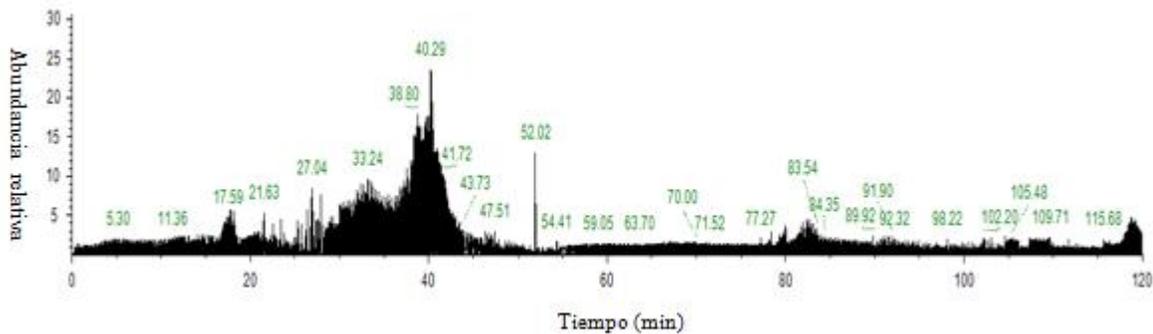


Figura 18. Muestra digerida eficientemente en solución. Se muestra el cromatograma de la inyección de 5 μg de péptidos provenientes de células HeLa en el espectrómetro de masas.

En la **Figura 18** se muestra el cromatograma de una alícuota proveniente de la digestión en solución de 100 μg de péptidos de células HeLa. Una vez digerida la muestra se desala por columnas C18 y posteriormente se inyecta al espectrómetro de masas por cromatografía líquida.

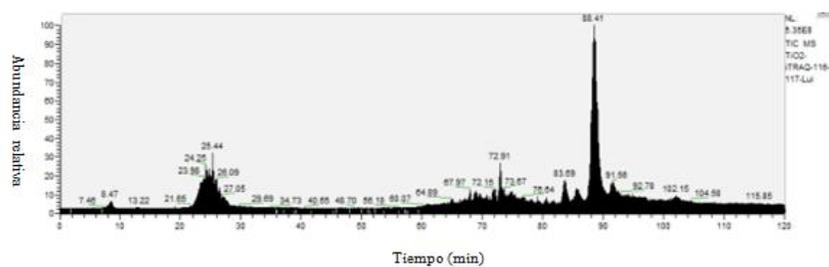
5.4.6 Etiquetado de muestras por iTRAQ

Ya que como uno de los objetivos es cuantificar la abundancia de los fosfopéptidos. Se realizó una digestión en solución de 500 µg de proteínas de células HeLa y se enriqueció por columnas de óxido de titanio. Como se muestra en la **Figura 19 A)** sólo se observa señal de los péptidos fosforilados en la fracción enriquecida. La fracción unida a la columna de titanio corresponde al 30% del total digerido. De esta fracción enriquecida se tomaron dos alícuotas de 15 µg cada una y se etiquetaron con los marcadores iTRAQ 116 y 117 respectivamente (como se indica en el manual de usuario). Después, se mezclaron e inyectaron 5 µg en el espectrómetro de masas y se identificaron 340 proteínas de las cuales 294 estaban fosforiladas (86.47%). De los 817 péptidos detectados con buena confiabilidad ($X_{corr} > 1$) 8.2 % no estaban fosforilados y el 42% estaban etiquetados con iTRAQ.

A)



B)



C)

Resumen de muestras de células HeLa etiquetadas con iTRAQ
❖ Identificamos 340 proteínas
❖ 294 proteínas fosforiladas (87%)
❖ Se identificaron 817 péptidos
❖ 750 péptidos fosforilados (92%)
❖ 42% de los péptidos etiquetados con iTRAQ

Figura 19. Muestras enriquecidas de células HeLa etiquetadas con iTRAQ. En A) se muestra inmunodot blot anti fosfo serina/treonina. En se muestra B) el cromatograma de la muestra etiquetada y en C) se muestra el resumen de los datos generados.

5.5 Identificación de cambios en el fosfoproteoma de células MA104 infectadas con rotavirus

5.5.1 Eficiencia de la purificación y etiquetado de las muestras

Para la purificación de fosfopéptidos y el análisis de la muestra etiquetada, se crecieron las células MA104 hasta llegar a sub confluencia en placas de 160 cm² y se dejaron 12 horas sin suero para disminuir el ruido de fondo de fosforilación. Posteriormente se infectaron a una MOI de 10 o se dejaron con MEM y se cosecharon las proteínas a las 2 y 6 horas post infección como se describe en la metodología. Brevemente, se digirieron 300 µg de proteínas de cada condición y se desalaron en columnas SepPak tC18. Posteriormente, se etiquetaron 100 µg de cada condición con marcadores iTRAQ durante 1 hora y se mezclaron. Los 400 µg totales obtenidos se pasaron por una columna TiO₂ para enriquecer

fosfopéptidos. La muestra enriquecida se desaló con un Zip Tip para analizar por espectrometría de masas.

El análisis de los espectros se observa en el cromatograma de la **Figura 20 A)** y se realizó comparando contra la base de datos de proteína de *Macaca mulatta* y Humano, ya que, como no se tiene una base de datos completa de mono verde (*Chlorocebus aethiops*); una forma factible de obtener el mayor número de proteínas sería buscando contra estas ambas bases de datos. En la **Figura 20 B)** se muestra la región en la que se encuentran las etiquetas iTRAQ (114-117) liberadas durante la fragmentación de los péptidos. La cuantificación para cada tiempo se realizó obteniendo el cociente de la abundancia de la condición de infección (115 para las 2 horas de infección ó 117 para las 6 horas de infección) entre la abundancia de la condición control sin infectar (114 para la 2 horas sin infección ó 116 para las 6 horas sin infección).

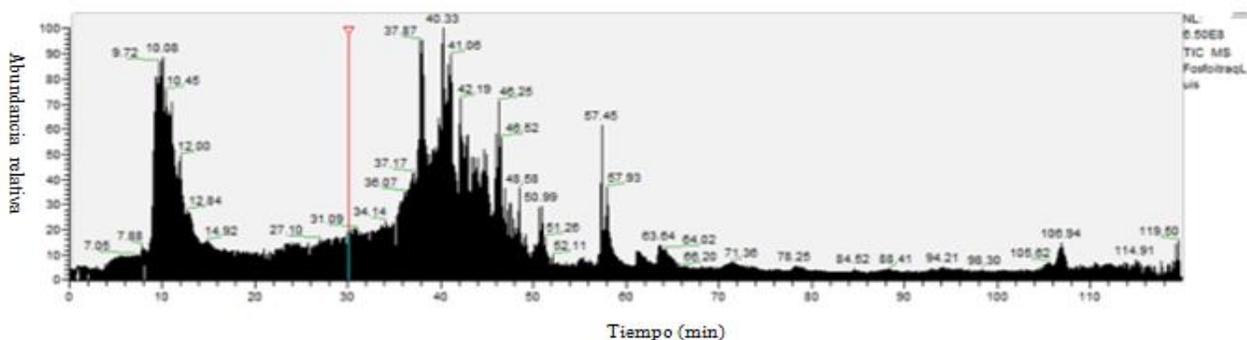
Los resultados de la **Figura 21 A) y B)** muestran que alrededor del 63% de las proteínas halladas corresponden a proteínas fosforiladas tanto en la base de datos de macaca como de humano. Por otro lado, al analizar el porcentaje de las proteínas fosforiladas etiquetadas con iTRAQ, se observó que alrededor del 80% de las proteínas están etiquetadas como se observa en la **Figura 21 C) y D)**. Incluyendo las proteínas que aparecen como rescatadas, ya que en estas la etiqueta solo se observaba en la condición de infección por lo que podrían ser proteínas que el virus induzca únicamente durante la infección o que se expresen en niveles muy bajos en las condiciones sin infección como para no ser detectadas.

5.5.2 Métodos de Fragmentación

De los métodos de fragmentación empleados [CID (del inglés *Collision Induced Dissociation*) y HCD (del inglés *High Collision Dissociation*)] se observa que el 38% de las secuencias obtenidas se identificaron por ambos métodos de fragmentación, 40% por CID y 22% por HCD para el caso de los de los péptidos obtenidos a partir de la base de datos de macaca [**Figura 22 A**]. Para los obtenidos del análisis a partir de bases de datos de humano, se encontró que el 40% de las secuencias de los péptidos se identificaron por ambos métodos de fragmentación, el 38% por CID y 22% por HCD [**Figura 22 B**].

Asimismo, se analizaron los péptidos hallados para las proteínas fosforiladas y se encontró que para las proteínas halladas en la base de datos de macaca el 85% de los péptidos corresponden a péptidos fosforilados. Para el caso de los hallados en la base de datos de humano alrededor del 82% de los péptidos son fosforilados.

A)



B)

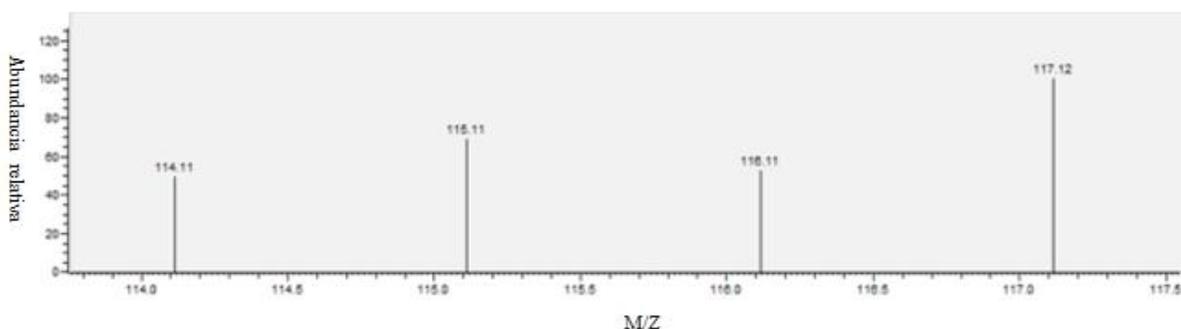
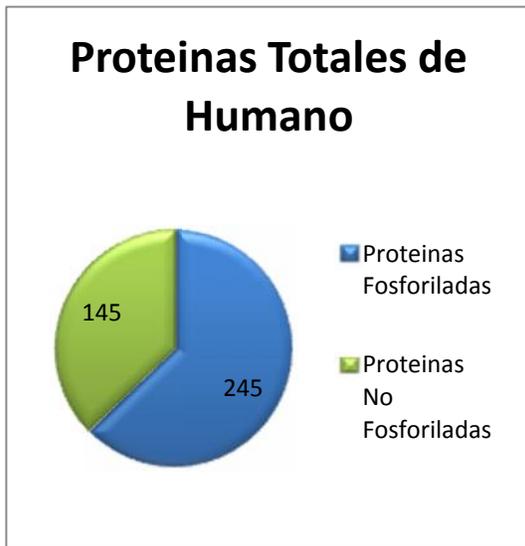
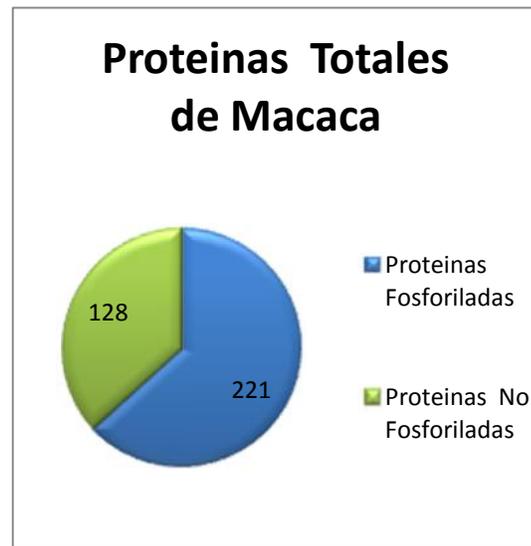


Figura 20. Cuantificación de péptidos etiquetados con iTRAQ provenientes de células MA104 infectadas durante 2 y 6 horas. Células MA104 se incubaron con MEM o se infectaron con una MOI 10 con la cepa de rotavirus RRV durante 2 y 6 horas respectivamente. Las muestras se procesaron como se describe en la metodología para la purificación de fosfopéptidos y el posterior análisis por espectrometría de masas. En **A)** se muestra el cromatograma de una mezcla de 5 µg de péptidos etiquetados con iTRAQ provenientes de las condiciones de infección y sin infectar. En **B)** se muestra una ampliación de la zona en la que se observan las etiquetas iTRAQ. La etiqueta 114 indica la abundancia del péptido proveniente de la condición de 2 horas sin infección, la etiqueta 115 corresponde a la condición de 2 horas de infección; la etiqueta 116 corresponde a las 6 horas sin infección y la etiqueta 117 corresponde a las 6 horas de infección. La cuantificación del péptido a 2 y 6 horas, se obtiene a partir del cociente de dividir la intensidad del péptido proveniente de la condición de infección entre la intensidad del péptido de la condición sin infectar.

A)



B)



C)

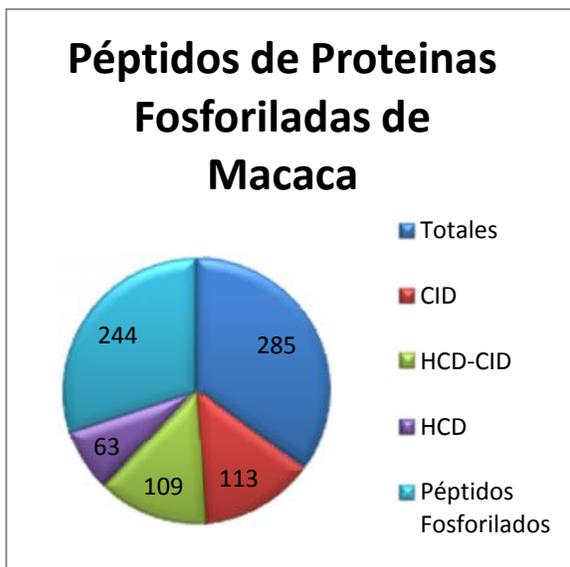


D)



Figura 21. Identificación de proteínas fosforiladas y etiquetadas con iTRAQ. En A) y B) se muestran el número de proteínas fosforiladas identificadas a partir de las muestras provenientes de las infecciones de 2 y 6 horas en células MA104 y analizadas contra bases de datos de proteínas humanas y de *Macaca mulatta*. En C) y D) se muestran el número de fosfoproteínas etiquetadas con iTRAQ para cada base de datos.

A)



B)

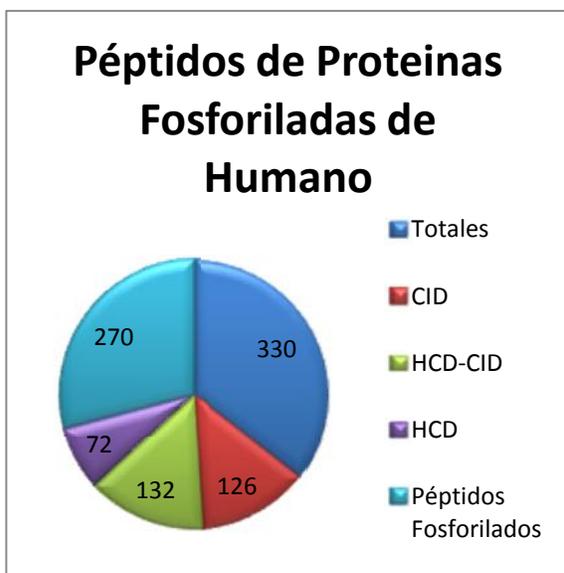


Figura 22. Métodos de fragmentación y número de péptidos fosforilados identificados a partir de las fosfoproteínas de los ensayos de infección en MA104. En A) y B) se compara el número de fosfopéptidos con respecto al total de péptidos identificados para las fosfoproteínas en las bases de datos de humano y *Macaca mulatta*. Así como el número de péptidos identificados por los diferentes métodos de fragmentación (CID o HCD) o ambos.

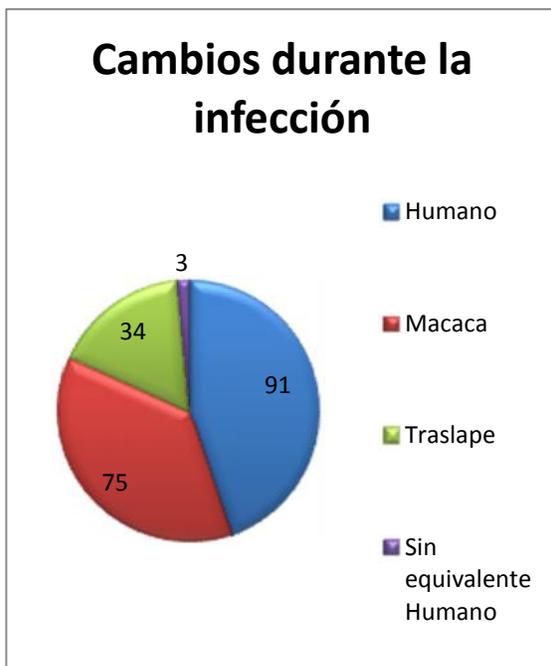
5.5.3 Proteínas y fosfositios que cambian durante la infección

De la lista de proteínas obtenidas, se seleccionaron aquellas que cambian durante la infección. Para ello se estableció como punto de corte aquellas fosfoproteínas que tienen un cociente mayor a 2 o menor a 0.5. En la **Figura 23 A)** se muestra que de la lista de proteínas halladas, 75 fosfoproteínas cambian para el caso de la base de datos de macaca y 91 para la base de datos de humano. De las proteínas halladas, 34 proteínas se hallaron en ambas bases de datos y 3 solo se encuentran en *Macaca mulatta* y no tienen equivalente en humano.

En la **Figura 23 B)** se observa que 127 fosfoproteínas cumplen con los criterios de corte a las 6 horas y 32 a las 2 horas. La tendencia general que se observa es que la mayoría cambia a las 6 horas.

Por otro lado, en la **Figura 24 A) y B)** al analizar los fosfositios de ambas bases de datos se encontraron 848 en la base de datos de humano y 712 en *Macaca mulatta*. De igual forma, se analizó el número de fosfositios que cambian durante la infección; para ello se tomó como punto de corte aquellos péptidos que aumentaron al menos al doble o disminuyeron a la mitad. Resultando en 277 (32.6 %) fosfositios que cambian en humano y 196 (27.5%) en macaca. En la **Figura 24 C)**, al sumar los fosfositios que cambian de ambas bases de datos resultan en 473 fosfositios. Sin embargo, sólo hay 360 fosfositios diferentes que cambian sumando ambas bases de datos, ya que se traslapan 113 entre ellas.

A)



B)



Figura 23. Fosfoproteínas que cambian significativamente durante la infección. Se seleccionaron como fosfoproteínas que cambian significativamente aquellas cuyo cociente es mayor a 2 o menor a 0.5. En A) se muestra el número de fosfoproteínas que cumplen con el criterio de corte en bases de datos de humano y *Macaca mulatta*, así como las fosfoproteínas que se encuentran en ambas bases de datos o solo en *Macaca mulatta*. En B) se sumaron las fosfoproteínas que son diferentes de ambas bases de datos y se graficaron aquellas que cambian a las 2 y 6 horas pos infección respectivamente.

A)



B)



C)



Figura 24. Identificación de fosfositos que cambian durante la infección por RRV. Se tomaron como fosfositos que cambian aquellos cuyo cociente del péptido en el que se encuentran es mayor a 2 o menor a 0.5. En **A)** y **B)** se muestran los fosfositos totales de las fosfoproteínas identificadas en *Macaca mulatta* y humano, así como aquellos fosfositos

que cumplen con el criterio de corte. En **C)** se sumaron los fosfositos que cumplen con el criterio de corte obtenidos a partir de ambas bases de datos y se muestran aquellos fosfositos compartidos en ambas bases de datos.

5.5.4 Análisis de redes

Con la finalidad de analizar las fosfoproteínas que cambian durante la infección, se utilizaron dos programas; IPA (Ingenuity System) y Panther Pathways, los cuales permiten generar redes de interacción así como las principales funciones y procesos biológicos en las que están involucradas. Estos programas para generar las redes de interacción hacen uso de interacciones ya reportadas en la literatura así como interacciones altamente predichas.

Al analizar los resultados obtenidos a las 2 horas de infección mediante Ingenuity, se obtienen 4 funciones asociadas a redes, entre las que destacan aquellas involucradas en expresión génica y procesos infecciosos [**Figura 25 A)**]. Asimismo, al analizar mediante Panther Pathways se observa que los principales procesos biológicos están relacionados a comunicación celular, procesos celulares y metabolismo [**Figura 26 A)**].

Los resultados obtenidos a partir de los datos de 6 horas de infección mediante Ingenuity muestran 5 funciones asociadas a redes. Destacando el metabolismo de carbohidratos y lípidos [**Figura 25 B)**]. Por otro lado, al analizar los procesos biológicos mediante Panther Pathways se observa que el principal en el cual se encuentran el mayor número de genes está relacionado al metabolismo [**Figura 26 B)**].

A)



B)

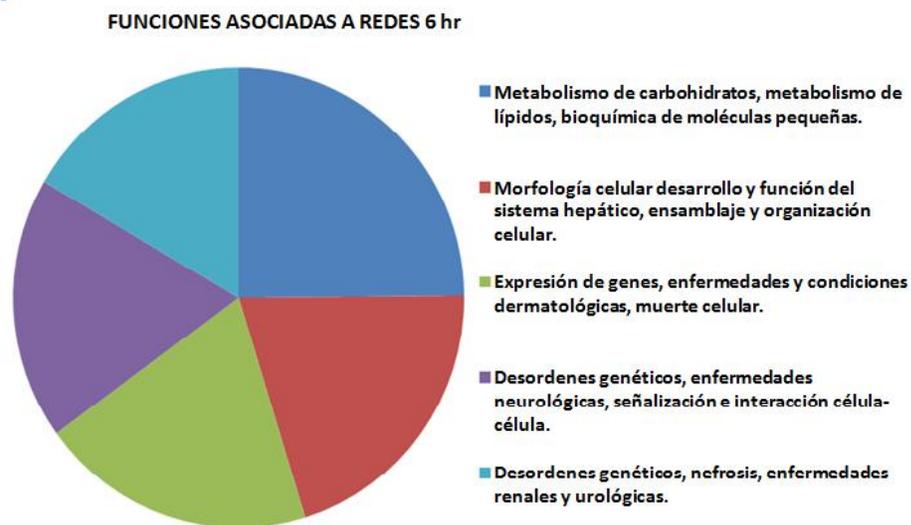
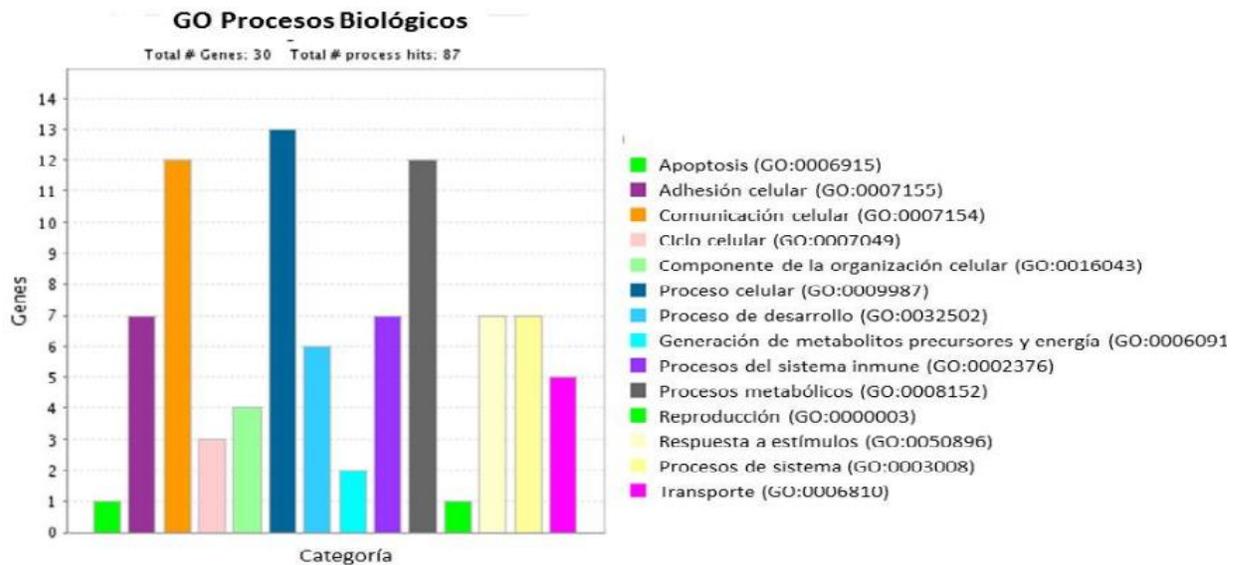


Figura 25. Redes y funciones asignadas a las proteínas que cambian durante la infección. Se analizaron 130 fosfoproteínas mediante la versión de prueba de Ingenuity System. En **A)** se muestran las redes y funciones obtenidas a las 2 horas y en **B)** las obtenidas a las 6 horas.

A)



B)

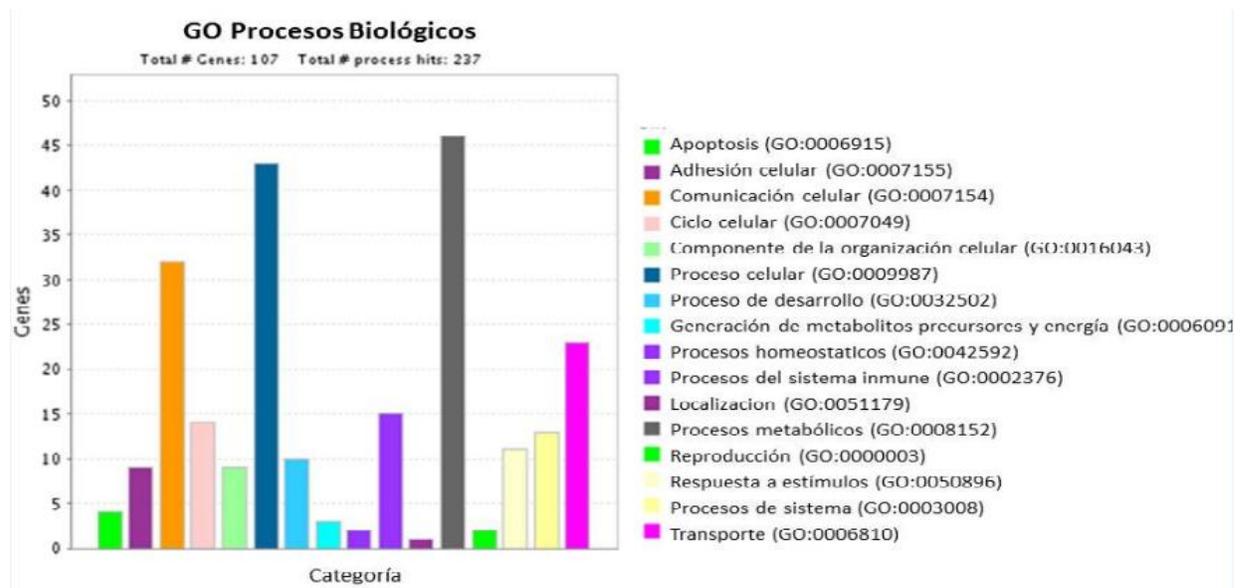


Figura 26. Procesos biológicos asociados a la infección. Se analizaron 130 fosfoproteínas mediante Panther Pathways. En **A)** se muestran los procesos biológicos obtenidos a las 2 horas de infección y en **B)** los obtenidos a las 6 horas.

6. Discusión

El objetivo de este estudio fué determinar el patrón de fosforilación durante la infección por rotavirus. Sin embargo, es importante determinar los tiempos que son de relevancia para llevar a cabo este estudio. Inicialmente se realizaron cinéticas de infección de 12 hr y 8 hr en células Caco-2 y MA104 respectivamente y se analizaron por western blot con anticuerpos anti fosfotirosinas. No obstante, no se pudo encontrar un tiempo en el cual se observaran cambios en el patrón de bandeo durante la infección (**Figuras 9 y 10**). Y ya que nos interesaban tiempos tempranos en los que se inicia la transcripción y tiempos mas tardios en los que hay producción de proteína viral, se encontraron en la literatura diversos ensayos que sugieren que a las 2 horas se empiezan a encender algunas cinasas, alcanzando un pico entre las 6 y 8 horas pos infección [39, 42-45, 81, 82]. Por lo cual, se decidieron analizar estos tiempos ya que podrían darnos una idea de los eventos iniciales de control celular esenciales durante la infección, así como aquellos involucrados durante etapas tardías de infección.

Para llevar a cabo este estudio, se plantearon dos estrategias para la purificación de fosfopéptidos: 1) purificación de fosfoproteínas y a partir de estas la purificación de los fosfopéptidos [54, 55]; 2) purificar los fosfopéptidos directamente de la mezcla compleja de péptidos [60, 62-66].

Para la purificación de fosfoproteínas, se decidieron usar columnas IMAC comerciales (Qiagen). Inicialmente se analizaron muestras provenientes de ensayos de infección de 2 horas. Sin embargo, los resultados obtenidos no muestran un enriquecimiento claro de fosfoproteínas ya que se esperaba una intensidad de las bandas enriquecidas entre unas 5 y

10 veces mayor con respecto al control (lisado total) como se ha reportado en otro ensayo, además que claramente se observa que no todas las bandas son enriquecidas con la misma eficiencia, ya que algunas bandas solo se observan en la fracción total sin enriquecer y tras pasarlas por las columnas su señal es muy baja (**Figura 11**) [54].

Como alternativa para el enriquecimiento de fosfoproteínas, se decidió usar el IMAC en batch ya que se han realizado diversos ensayos para la optimización de la técnica IMAC así como variantes de esta para la obtención de fosforesiduos. Uno de ellos señala una eficiencia de alrededor del 90% mediante la técnica en batch [54, 55], por lo cual decidimos realizar un breve ensayo con este método y compararlo con las columnas IMAC comerciales de Qiagen para determinar cuál era la más eficiente. Los resultados obtenidos reflejan que en las condiciones llevadas a cabo el experimento, sugieren que las columnas de Qiagen son más eficientes que la técnica en batch [**Figura 12 A**]. Sin embargo, cuando se analiza el enriquecimiento de la fosfoproteína viral NSP5 por western blot [**Figura 12 B**], se observa que hay un mayor enriquecimiento mediante la técnica en batch comparado con las columnas de Qiagen y ésta podría mejorarse estableciendo un mejor método de elución, ya que al tratar nuevamente las resinas eluidas con buffer Laemly se obtiene una mayor cantidad de fosfoproteína, lo cual indica que no se había logrado un despegado eficiente de fosfoproteínas.

De manera alterna, decidimos usar la segunda estrategia que consistía en purificar directamente los fosfopéptidos. Como se ha mencionado, hay diversas publicaciones que afirman que bajo ciertas condiciones en la columna IMAC se puede lograr una eficiente purificación de fosfopéptidos, sin embargo, estas variaciones pueden resultar en una alta

pureza de la muestra pero poca cantidad de la misma o viceversa [32, 46, 54, 62]. No obstante, algunos afirman que se puede llegar a obtener buenos resultados sin comprometer la calidad ni la cantidad de la muestra obteniendo eficiencias arriba del 90% [62]. Con la finalidad de evaluar la eficiencia de purificación de fosfopéptidos, decidimos emplear columnas comerciales IMAC-Galio. Inicialmente partimos de lisados celulares de ensayos de infección de 6 horas. Como control, se inyectó una muestra de péptidos totales no purificados provenientes de este ensayo de infección al espectrómetro de masas y efectivamente no se detectaron péptidos fosforilados, lo cual es lo que se esperaba con base a la literatura, ya que los fosfopéptidos son muy poco abundantes y además presentan poca ionización comparado con los péptidos no fosforilados (**Figura 14**). Sin embargo, al enriquecer la muestra pasándola por las columnas comerciales IMAC-galio se observa que el 30 % (9 proteínas) de las proteínas están fosforiladas (**Figura 15**). Una posible explicación de la baja eficiencia, es que en estos ensayos se utilizaron columnas C18 de baja capacidad de desalado y dichas sales interfieren con la capacidad de pegado específico de los grupos fosfatos de los fosfopéptidos hacia el metal de la columna IMAC [60, 62, 65].

Diversos estudios demuestran que la eficiencia de la columna IMAC (alrededor del 75%) se puede aumentar significativamente hasta en un 90% [32, 37, 46, 54, 62] si se acopla a otra técnica de purificación tal como columnas de dióxido de titanio o de intercambio catiónico fuerte. Las columnas de dióxido de titanio tienen una alta especificidad por los fosfopéptidos, además que se puede incrementar su afinidad incubando las muestras con DHB (ácido dihidroxibenzoico), el cual reduce la unión inespecífica de péptidos ácidos no fosforilados mientras retiene su alta afinidad por los fosfopéptidos, siendo de esta manera más selectiva que el IMAC [32, 64]. Como ya se han caracterizado diversos estudios de

fosfoproteómica en células HeLa, decidimos evaluar nuestra metodología en esta línea celular como control de que esta funcionando eficientemente. Para ello, se purificaron fosfopéptidos de células HeLa usando columnas de dióxido de titanio y se inyectaron en el espectrómetro de masas [**Figura 17 B**) y C)]. Se encontró que el 48% de 198 proteínas estaban fosforiladas.

Los datos sugieren que las columnas de óxido de titanio y las columnas IMAC-Ga enriquecen las muestras en fosfoproteínas de manera similar, 48% y 30% respectivamente. Sin embargo, se detectaron 95 fosfoproteínas en la muestra que se pasó por dióxido de titanio [**Figura 17 C**)] mientras que con las columnas IMAC-Ga solo se detectaron 9 fosfoproteínas [**Figura 15 B**)]. Estos resultados sugieren que las columnas de dióxido de titanio son más eficientes que las columnas IMAC-Ga. Para corroborar estos resultados, se decidió emplear un método diferente a la espectrometría de masas. Por ello, se decidió emplear el inmuno-dot blot ya que permite determinar la calidad de la muestra enriquecida, permite detectar selectivamente péptidos fosforilados en serina, treonina o tirosina, los materiales utilizados comúnmente se encuentran en el laboratorio y evita gastar materiales y tiempo si nuestra muestra no esta fosforilada. [80].

Al comparar por dot-blot el enriquecimiento realizado por las columnas de óxido de titanio y columnas IMAC-Ga, se observa que los fosfopéptidos son retenidos eficientemente en la columna de óxido de titanio, ya que sólo se observa señal en la fracción eluida, mientras que las columnas IMAC-Ga se observan los fosfopéptidos tanto en la fracción no unida como en el eluido (en menor intensidad). Lo cual sugiere que la capacidad de retención de

estas columnas es mucho menor que las de óxido de titanio y por tanto, menos eficiente en el enriquecimiento de fosfopéptidos [**Figura 17 A**].

Los resultados sugieren que tenemos las condiciones adecuadas para la purificación de fosfopéptidos, sin embargo, se trató de montar la digestión en solución, ya que en este tipo de digestión hay muy poca manipulación de la muestra, la digestión se realiza en un sólo tubo, además que es mucho más rápida que la digestión en gel ya que el proceso tarda tan solo un día. Cuando inicialmente se trato de montar la digestión en solución, no funcionaba, ya que al introducir la muestra al espectrómetro de masas se observaba solo el ruido de fondo (**Figura 13**). Esto se debía a la presencia de gran cantidad de sales que impedían el análisis de la muestra. Este problema pudo resolverse empleando columnas C18 de alta capacidad de desalado, como se observa en la **Figura 18**.

Una parte importante del estudio era determinar los cambios en el perfil de fosforilación mediante el uso de etiquetas iTRAQ, las cuales indican las abundancias relativas de los fosfopéptidos en las diferentes condiciones. Para ello, se decidió evaluar el etiquetado de las muestras con las condiciones de procesamiento ya montadas. Al analizar nuevamente muestras provenientes de células HeLa digeridas en solución, se determinó que el 87% de las 340 proteínas totales estaban fosforiladas [**Figura 19 A**]. Por otro lado, de los péptidos totales, el 92% estaban fosforilados y el 42% estaban etiquetados con iTRAQ. Como se observa, las eficiencias de purificación de fosfopéptidos aumentaron al doble comparado con el ensayo de la **Figura 17**, probablemente debido a que a esta concentración de las muestras no se satura la columna y se logra menor inespecificidad. Además que el uso de

cartuchos C18 favorece un mejor desalado de las muestras, lo cual permite una mejor interacción del óxido de titanio con los péptidos fosforilados.

En vista que se tenía un método que permitía purificar los fosfopéptidos y que además es compatible con el método de cuantificación, se decidió evaluar los cambios en el perfil de fosforilación de células MA104 infectadas con rotavirus. Para analizar tales cambios, se necesita de una base de datos de proteínas del organismo a estudiar para identificar las proteínas involucradas. No obstante, no se tiene la base de datos de proteínas de la línea celular MA104 ya que no se ha secuenciado el genoma de Mono Verde (*Chlorocebus aethiops*) del cual proviene dicha línea. La mejor estrategia que se podría emplear con la finalidad de identificar el mayor número de proteínas posibles, es usar bases de datos de proteínas de organismos cuyo genoma se conoce y que además son cercanos al modelo de estudio. En base a esto, se utilizaron dos bases de datos de proteínas; una de humano y otra de *Macaca mulatta*. Al realizar el ensayo e identificar las proteínas por espectrometría de masas usando de manera independiente cada base de datos, se determinó que alrededor del 63% de las proteínas halladas corresponden a proteínas fosforiladas y además que el 80% de estas proteínas están etiquetadas con iTRAQ [**Figura 21**]. Cabe mencionar que dentro de las proteínas etiquetadas, las abundancias de alrededor del 7% de estas fueron determinadas al hacer el análisis manual de los espectros de dichas proteínas, ya que como el programa expresa los cambios como cociente (donde la intensidad de la condición de infección se divide entre la intensidad de la condición control sin infectar), todas aquellas proteínas que se expresan solo en la condición de infección o su abundancia es mucho mayor en la condición de infección que en la condición control, sus valores no los puede determinar el programa y por tanto no aparecen en los resultados finales. Por eso el análisis manual

permite rescatar estas proteínas que podrían ser muy importantes, ya que solo se observan durante la infección y podrían estar involucradas en el éxito que tiene el virus al infectar.

Al analizar los péptidos de las proteínas fosforiladas, se determinó que para la base de datos de *Macaca mulatta*, el 85% de los péptidos corresponden a péptidos fosforilados. Para el caso de los hallados en la base de datos de humano alrededor del 82% de los péptidos están fosforilados [**Figura 22**].

Por otro lado, durante la inyección de la muestra en el espectrómetro de masas, se utilizaron 2 métodos de fragmentación: CID; el cual se utiliza principalmente para la secuenciación *de novo* de los péptidos y HCD; que principalmente se usa para liberar las etiquetas iTRAQ (114, 115, 116 y 117) de los péptidos permitiendo cuantificar su abundancia relativa, aunque también permite la secuenciación *de novo* de los péptidos. Para evaluar las secuencias de los péptidos obtenidos, se determinó cuantas secuencias se obtuvieron por ambos métodos de fragmentación o por alguno de ellos. Los resultados muestran que 40% de las secuencias se obtuvieron por ambos métodos de fragmentación, 38 % por CID y solo el 22% se obtuvo por HCD. Cumpliendo con lo esperado, ya que como se ha mencionado esta última se utiliza para cuantificar la abundancia de las etiquetas [**Figura 22**].

Posteriormente, de la lista de fosfoproteínas obtenidas se seleccionaron como cambios durante la infección aquellas que aumentan al doble o disminuyen a la mitad. Al analizarlas, se hallaron 91 fosfoproteínas que cambian en la base de datos de humano y 75 fosfoproteínas que cambian en la base de datos de *Macaca*. De las cuáles 34 fosfoproteínas se traslapan en ambas bases de datos (20%). Por otro lado, al analizar los tiempos en los

que cambian estas fosfoproteínas, alrededor del 80% de ellas tienden a cambiar a las 6 horas de infección [**Figura 23 B**]. Cabe mencionar que dentro del ensayo se pudieron identificar proteínas no fosforiladas debido a la interacción inespecífica que presentan los residuos ácidos de péptidos no fosforilados con el óxido de titanio [64]. Dentro de estas proteínas no fosforiladas, se identificaron 57 proteínas que cambian su expresión durante la infección (Tabla 2. Proteínas no fosforiladas que cambian durante la infección).

De los fosfopéptidos hallados por cada base de datos, se determinaron el número de sitios de fosforilación que se encuentran en los fosfopéptidos que cumplen con el criterio de corte de cambio durante la infección (es decir, aumentan al doble o disminuyen a la mitad su abundancia) y se encontró que 360 fosfositos cumplen con este criterio. De esta forma este tipo de estrategias permite no solo cuantificar los cambios a nivel de proteína sino también a nivel de sitio de fosforilación. Permitiendo agregar a la literatura nuevos sitios de regulación que no se han reportado [**Figura 24**].

Ya que se obtuvo la lista de proteínas que cambian su estado de fosforilación durante la infección, era importante tratar de darle un sentido biológico a esta lista de proteínas en el contexto de la infección. Para ello, se decidió analizar si este conjunto de proteínas estaban implicadas en alguna vía en particular. Este objetivo se logró empleando dos programas, Panther Pathways e IPA de Ingenuity Systems, los cuáles permiten generar redes de interacción de proteínas y asignar funciones generales a partir de datos experimentales reportados en la literatura que señalan la interacción de ciertas proteínas o que se predicen su interacción. A este análisis se sometieron 130 fosfoproteínas que cumplieron con el criterio de corte durante la infección y se encontró que a las 2 horas se encuentra redes que

principalmente tienen que ver con expresión génica y mecanismos de infección seguido por metabolismo de aminoácidos y crecimiento celular principalmente. Además que en los procesos biológicos principales se encuentran comunicación celular y procesos metabólicos. Estos resultados pueden tener sentido ya que se ha reportado que a las 2 horas de infección se inducen genes de respuesta antiviral, además que se activan rutas que están relacionadas con proliferación celular e inhibición de la apoptosis tales como PI3K/Akt y NF- κ B, las cuáles se ha observado que se pueden activar por NSP1 así como por HSP90 [Figura 27] [42, 43, 86].

A partir de los datos de 6 horas de infección las principales redes que se observan tienen que ver con metabolismo de carbohidratos, metabolismo de lípidos seguido por ensamblaje y organización celular. Estos datos sugieren que a este tiempo el virus está activando el metabolismo celular para su beneficio ya sea que de esta forma pueda inducir indirectamente el aumento en la síntesis de proteína viral o de estructuras que intervienen durante la morfogénesis viral.

Se ha reportado que para la formación de partículas infecciosas en hepatitis C y dengue se requieren de organelos intracelulares llamados gotas lipídicas, los cuales están involucrados en el metabolismo de lípidos y carbohidratos [87, 88][Figura 22 B)]. Recientemente se ha demostrado que los viroplasmos de rotavirus colocalizan e interactúan con componentes de las gotas lipídicas y esto parece ser dependiente del tiempo de infección. Por otro lado, al hacer uso de fármacos que interfieren con la formación de estas estructuras, resulta en la disminución del número y tamaño de viroplasmos, así como la inhibición de la replicación del RNA de doble cadena y la disminución del número de partículas infecciosas[89].

Asimismo, dicho metabolismo de lípidos se requiere tanto *in vitro* como *in vivo*. Ya que se observó durante la infección aumentan los niveles de triglicéridos en la célula y el tratamiento con sales biliares primarias o agonistas del receptor de dichas sales (FXR) disminuyen la replicación viral tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo murino, resultando en la reducción del número de partículas en heces, lo cual correlaciona con la disminución de triglicéridos y ésteres de colesterol [90].

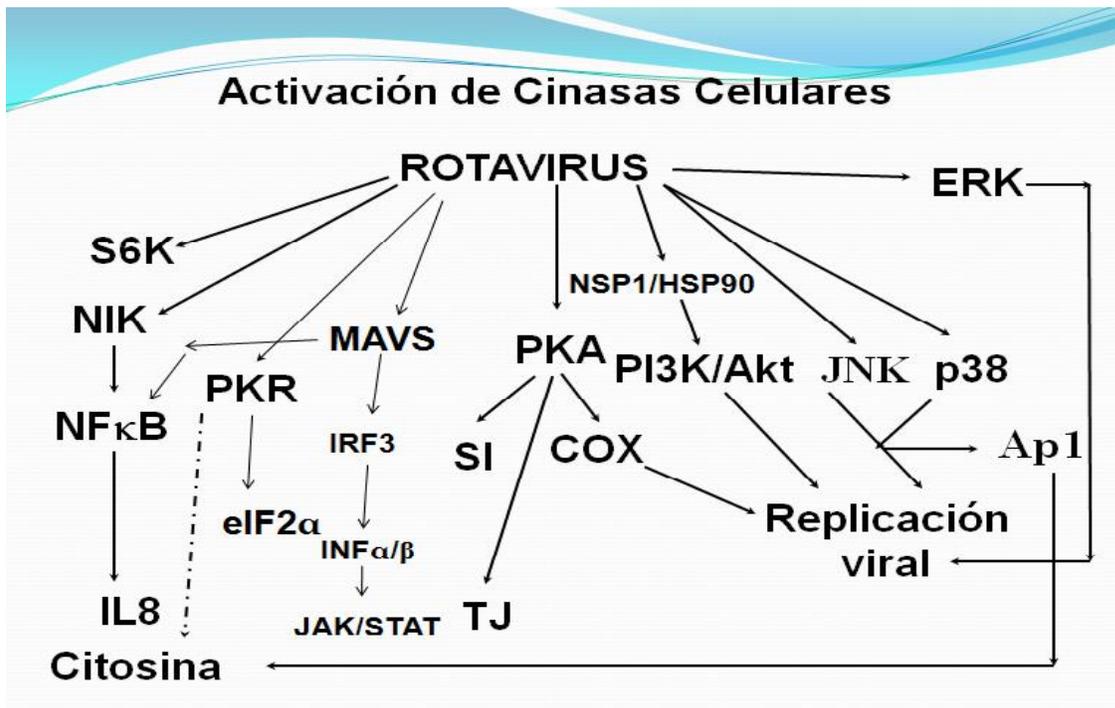


Figura 27. Activación de Cinasas durante la infección. En esta figura se muestran las rutas de señalización en las que están involucradas cinasas activadas durante la infección.

En la **Figura 27** se representan diversas vías de señalización relacionadas con cinasas que se han reportado se activan durante la infección por rotavirus [39-44, 81, 82, 91, 92]. Con la finalidad de evaluar los resultados obtenidos, se decidió determinar cuáles de las vías ya reportadas (**Figura 23**) pudimos identificar en este análisis.

La vía de las MAPK se ha visto que juega un papel importante en el crecimiento, supervivencia y diferenciación celular. Dentro de esta vía se puede encontrar a P38, JNK 1/2 y ERK 1/2 [93]. ERK 1/2 es una proteína que se ha reportado su fosforilación tras la infección con rotavirus en líneas celulares de colangiocitos y ductos biliares extrahepáticos de ratón. La inhibición de la activación de ERK1/2 usando inhibidores farmacológicos resulta en la disminución de la citólisis y además en la disminución del título viral en un 40% [81]. En este ensayo no pudimos detectar directamente a ERK 1/2. Sin embargo, se pudieron detectar algunas proteínas que se sabe están río arriba en la vía de señalización de las MAP cinasas como RASGRF1 y SOS1 (ver Tabla 1, ID 5923 y 6654, respectivamente), los cuáles son factores intercambiadores de nucleótidos de guanina y esto puede estar en concordancia que la vía de las MAP cinasas es importante durante la infección [94, 95].

Dentro de la familia de las MAP cinasas, se ha reportado que p38 es una cinasa que se activa durante la infección por rotavirus en diferentes líneas celulares como MA104, Caco-2, colangiocitos y ductos biliares extrahepáticos de ratón. En MA104 se ha visto que p38 se activa desde las 6 horas post infección (hpi) y alcanza un máximo de activación a las 8 hpi. El uso de inhibidores farmacológicos que impiden la activación de p38 resulta en la disminución del título viral en un 50% sin comprometer la producción de proteína viral[39]. En este ensayo se pudo detectar una de las isoformas de la proteína p38, p38 delta (ver Tabla 2, ID 5603). Sin embargo, esta proteína se detectó mediante un péptido no fosforilado que indica que su expresión aumenta al doble a las 6 hpi. En el trabajo anteriormente citado se muestra que no cambia la expresión de p38 sino mas bien su nivel de fosforilación [39]. No obstante, el anticuerpo usado en ese artículo es un anticuerpo policlonal que no distingue entre las diferentes isoformas. Por lo que para evaluar el cambio

en la expresión de p38 delta, sería necesario utilizar un anticuerpo específico dirigido contra esta.

Se ha reportado que durante la infección, la vía PI3K/Akt se activa por el virus para promover la supervivencia celular, dicha activación resulta en que células epiteliales intestinales se queden adheridas más tiempo a placas tratadas con colágeno y de esta forma el virus puede generar una mayor progenie viral [42, 43, 86]. En este ensayo encontramos la subunidad catalítica PI3KBeta (Tabla 1, ID 5291) la cual aumenta casi 3 veces su fosforilación a las 6 hpi. Sin embargo, el sitio de fosforilación que identificamos es un sitio nuevo comparado con los 17 ya reportados en PhosphositePlus por espectrometría de masas (<http://www.phosphosite.org/homeAction.do>), por lo que la funcionalidad que pudiera tener es desconocida y tendría que validarse mediante métodos alternos.

De igual forma durante la infección por rotavirus se ha observado un efecto en la estructura de las uniones intercelulares como las TJ (uniones estrechas). Una de las proteínas afectadas es la ocludina, la cual se ha observado disminuyen sus niveles de mRNA [96]. Las JAM pertenecen a una familia de inmunoglobulinas que se expresan en las uniones intercelulares de células epiteliales y endoteliales así como en la superficie de plaquetas, leucocitos y eritrocitos. Estas proteínas intervienen en diferentes procesos celulares como ensamblaje de uniones estrechas, transmigración de leucocitos, angiogénesis y unión de virus [97, 98]. Se ha observado que dentro de la familia Reoviridae, reovirus requiere de la interacción con JAM-A para entrar en su célula huésped [99]. De hecho se ha observado que si incubas células con anticuerpos contra JAM-A se bloquea la infección viral [100]. Además, si se expresa JAM-A exógena en células resistentes a la infección estas se vuelven permisivas

[101]. En los ensayos realizados hallamos a JAML (Tabla 1, ID 120425) la cual pertenece a la familia de las JAM. Se observa que el nivel de fosforilación de esta proteína se duplica desde las dos horas post infección y alcanza un incremento de hasta casi 19 veces a las 6 hpi. Estos datos podrían sugerir que esta proteína tiene un papel en la entrada durante la infección.

Otra cinasa que se sabe se induce su activación durante la infección es S6K, cuyo papel es fosforilar a la proteína S6 de la subunidad ribosomal 40S[102]. Se ha reportado que la inhibición de S6K trae como resultado la inhibición de la traducción de mRNAs que codifican para proteínas ribosomales y factores de elongación de la traducción[103].

Asimismo, se ha sugerido que durante la infección por rotavirus la síntesis de proteínas se incrementa, ya que al comparar el perfil de polisomas a las 6 hpi, en condiciones de estrés o sin infectar, solo en la condición de infección se observa un perfil prominente[44]. En este estudio encontramos una proteína no fosforilada que aumenta mas de dos veces su expresión a las 6 hpi (ver Tabla 2, ID 1915). Esta proteína es un factor de elongación de la traducción (EEF-1) cuyo papel es entregar los aminoacil-tRNA al ribosoma, esto tiene concordancia con lo ya previamente reportado sobre el aumento de la traducción durante la infección y puede sugerir que esta proteína es importante para rotavirus. Ya que se ha encontrado evidencia en el laboratorio que sugiere que EEF-1 puede interaccionar con NSP5, aunque su funcionalidad no ha sido explorada.

Asimismo, rotavirus puede encender rutas antivirales que pueden resultar en la producción de citocinas pro inflamatorias, las cuáles contienden con la infección ya que pueden ayudar a reclutar células de la respuesta inmune. Algunas citocinas que se conoce que aumentan

son RANTES e IL-8 [104, 105]. CXCL10 es otra citocina que también se ha observado aumenta su expresión durante la infección, tanto en líneas celulares como HT-29 desde las 8 hpi así como *in vivo* en modelos murinos [106, 107]. En este análisis pudimos encontrar esta proteína (ver Tabla 2, ID 3627) y se observa que su expresión aumenta más de dos veces a las 6 hpi, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura sobre el efecto de la infección en los niveles de esta proteína.

Por otro lado, además de identificar las vías ya reportadas en la **Figura 23**, se encontraron otras proteínas implicadas en otras vías que podrían ser novedosas o que podrían ayudar a explicar otros eventos que se conoce ocurren durante la infección. Por ejemplo, se ha reportado que rotavirus induce un remodelamiento de la red de microtubulos desde las 6 horas post infección[108]. Por inmunofluorescencias, se observa una colocalización de los microtúbulos con viroplasmos. Algunas de las proteínas que se identificaron participan en este proceso son NSP2 y NSP4. NSP2 interactúa con microtúbulos a través de un surco cargado positivamente y NSP5 compite con los microtubulos por este sitio de unión[108]. De igual forma, se ha visto que NSP4 por si sola puede inducir la depolimerización de microtúbulos en células transfectadas con la construcción de esta proteína [109]. Tanto con NSP4 como con NSP2 se observa que la depolimerización de microtúbulos resulta en la formación de una estructura en forma de anillo de microtúbulos en la periferia de la célula, así como gránulos en los cuáles colocalizan estas proteínas virales con microtúbulos [108, 109]. Los motores moleculares usan los microtúbulos como “pistas” por donde mueven vesículas, proteínas u organelos celulares. Estos motores moleculares son las dyneínas, las kinesinas y dynactinas. Dentro de las proteínas que cambian obtenidos por el análisis proteómico encontramos a estos tres motores moleculares. A las 6 hpi, dynactina aumenta

26 veces su expresión y tanto dyneina como kinesina aumentan más de dos veces su fosforilación con respecto al control sin infectar. Se ha reportado que dynactina es un complejo molecular que interactúa con dyneina y kinesina. Participando en diferentes procesos celulares como transporte de proteínas de ER a Golgi, movimiento de endosomas y lisosomas, movimiento de cromosomas, transporte de gotas lipídicas, así como en la dinámica de microtúbulos[110, 111]. Estas proteínas podrían ser de interés ya que como se ha mencionado muchos de estos procesos celulares ocurren durante la infección por rotavirus.

Los datos obtenidos a partir de este enfoque permiten sugerir nuevos blancos a estudiar y de igual forma concuerdan con vías ya reportadas inducidas durante la infección, ya que al menos se puede identificar alguna proteína dentro de la vía. Aquellas proteínas que no se pudieron detectar en el análisis podría explicarse por varios factores. Uno sería que las muestras provienen de un organismo cuyo genoma no se ha secuenciado por lo que al hacer uso de bases de datos de organismos relacionados para hallar proteínas, no significa necesariamente que la cobertura sea total, ya que diferencias aun sutiles que resulten en cambios de un solo aminoácido traen como consecuencia que no se pueda identificar el péptido y por lo tanto tampoco la proteína a la que pertenece. Otro factor que interviene en la identificación de los péptidos es la resolución de las muestras. Se ha observado que el uso de columnas bidimensionales permiten separar de manera más eficiente los péptidos que eluyen de la columna disminuyendo la complejidad de la muestra. Otra estrategia para resolver las muestras es pre fraccionarlas antes de inyectar, para así disminuir la complejidad y permitir que los péptidos menos abundantes puedan ser observados.

Asimismo, el etiquetado de las muestras con iTRAQ se realizó antes de la purificación de

los fosfopéptidos. Esto confiere ciertas ventajas, ya que se puede mezclar las muestras etiquetadas en un solo tubo y purificar los fosfopéptidos en una sola columna de óxido de titanio permitiendo menos manipulación de la muestra y menos variabilidad de los resultados. Si se hubieran etiquetado las muestras después de haber purificado los fosfopéptidos se hubieran necesitado 4 columnas de óxido de titanio para llevar a cabo dicha purificación, lo cual provocaría cierta variación ya que todas las columnas no necesariamente funcionan exactamente igual. Además, después de la purificación hubiera sido necesario cuantificar los fosfopéptidos para etiquetar la misma cantidad de muestra de cada condición, lo cual podría también introducir cierta variación.

Por otro lado, la estrategia empleada no solo permite evaluar los cambios globales de fosforilación (Tabla 1) sino también los cambios en la expresión de proteínas (Tabla 2). Estas proteínas provienen de los péptidos que se lograron unir a las columnas de TiO₂ de manera inespecífica y son importantes, ya que permiten evaluar mas candidatos que están involucrados en la infección y de esta manera complementan los resultados de fosforilación para así establecer un mecanismo de acción mas detallado. Sin embargo, para tener una mayor certeza de los resultados es necesario evaluar las proteínas identificadas mediante métodos alternos que corroboren su fosforilación y cambios de expresión.

7. Conclusiones

- 1. Se logró estandarizar un método para la purificación de fosfopéptidos y etiquetado de las muestras con iTRAQ.**
- 2. Pudimos detectar y analizar los fosfopéptidos tanto por inmunodot blot como por espectrometría de masas.**
- 3. Se hallaron 130 fosfoproteínas totales que cambian durante la infección a 2 y 6 horas.**
- 4. A las 2 horas de infección encontramos 32 fosfoproteínas que cambian.**
- 5. A las 6 horas de infección encontramos 127 fosfoproteínas que cambian.**
- 6. Se encontraron 360 fosfositos pertenecientes a los péptidos que cambian durante la infección.**
- 7. Las principales funciones asociadas a redes a las 2 y 6 hrs son, expresión génica/mecanismos de infección y metabolismo de carbohidratos/lípidos.**
- 8. Uno de los principales procesos biológicos a las 2 y 6 horas son, comunicación celular y procesos metabólicos.**

8. Perspectivas

Demostrar por otros métodos que las proteínas halladas en el análisis realmente cambian ya sea usando anticuerpos fosfoespecífico en ensayos de western blot o evaluando la cantidad de mensajero de la proteína blanco en la condición de infección comparada con el control sin infectar.

Una vez que se haya demostrado que las proteínas realmente cambian durante la infección, lo siguiente sería evaluar el papel que tienen estas proteínas para el virus ya sea en etapas tempranas o tardías de la infección. Una estrategia que podría emplearse son los ensayos de interferencia celular en los cuáles se inducen la disminución de las proteínas blanco y posteriormente se realizan los ensayos de infección para determinar las unidades formadoras de focos en ensayos de infectividad o de progenie viral.

Una de las vías que sería interesante analizar es aquella relacionada al metabolismo de lípidos y carbohidratos, ya que es una de las vías más representadas en nuestro análisis además que recientemente se ha demostrado que hay co localización de triglicéridos con los centros de replicación viral conforme avanza la infección. Asimismo, drogas que interfieren con la síntesis de éstos, resultan en una disminución del número y tamaño de los viroplasmas, así como una reducción en el título viral [89].

9. Referencias

1. Parashar, U.D., et al., *Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children*. Emerg Infect Dis, 2003. 9(5): p. 565-72.
2. López, S.y.A., C.F. , *Los rotavirus*. In E. [1]M. Romero y J.C. Martínez, e. Microbios, Editor. 2003.
3. Ramig, R.F., *Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection*. J Virol, 2004. 78(19): p. 10213-20.
4. Estes, M.K., *Rotaviruses and their replication*. In B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman y S. E. Straus ed. Virology. Vol. 2. 2001, New York: Raven Press. 1747-1785.
5. Su, C.Q., et al., *An outbreak of epidemic diarrhoea in adults caused by a new rotavirus in Anhui Province of China in the summer of 1983*. J Med Virol, 1986. 19(2): p. 167-73.
6. Coulson, B.S., L. E. Unicomb, G. A. Pitson y R. F. Bishop, *Simple and specific enzyme immunoassay using monoclonal antibodies for serotyping human rotaviruses*. J. Clin Microbiol 1987. 25: p. 509-515.
7. Hoshino, Y., et al., *Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(24): p. 8701-4.
8. Larralde, G. and M. Gorziglia, *Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4*. J Virol, 1992. 66(12): p. 7438-43.
9. Matthijssens, J., et al., *Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments*. Arch Virol, 2008. 153(8): p. 1621-9.
10. Patton, J.T., et al., *Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome*. J Virol, 1997. 71(12): p. 9618-26.
11. Zeng, C.Q., et al., *Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants*. J Virol, 1996. 70(5): p. 2736-42.
12. Liu, M., N.M. Mattion, and M.K. Estes, *Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity*. Virology, 1992. 188(1): p. 77-84.
13. Chen, D., et al., *Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase*. Virology, 1999. 265(1): p. 120-30.
14. Gray, J., Desselberg, U., *Rotavirus. Methodos and Protocols*. 2000: Humana Press.
15. Shaw, R., Greenberg, HB. y Estes, MK. , *Rotaviruses (Reoviridae)*. Acad. Press., 1999.
16. Dormitzer, P.R. and H.B. Greenberg, *Calcium chelation induces a conformational change in recombinant herpes simplex virus-1-expressed rotavirus VP7*. Virology, 1992. 189(2): p. 828-32.
17. Estes, M.K., et al., *Rotavirus stability and inactivation*. J Gen Virol, 1979. 43(2): p. 403-9.
18. Shahrabadi, M.S. and P.W. Lee, *Bovine rotavirus maturation is a calcium-dependent process*. Virology, 1986. 152(2): p. 298-307.
19. Feng, N., et al., *Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts*. J Virol, 2009. 83(14): p. 6987-94.
20. Sotelo, P.H., et al., *Analysis of rotavirus non-structural protein NSP5 by mass spectrometry reveals a complex phosphorylation pattern*. Virus Res. 149(1): p. 104-8.
21. Afrikanova, I., et al., *Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5*. J Gen Virol, 1996. 77 (Pt 9): p. 2059-65.

22. Contin, R., et al., *Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins*. J Gen Virol. 91(Pt 7): p. 1782-93.
23. Ball, J.M., et al., *Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein*. Science, 1996. 272(5258): p. 101-4.
24. Morris, A.P., et al., *NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca(2+)mediated I(-) influx into intestinal crypts of CF mice*. Am J Physiol, 1999. 277(2 Pt 1): p. G431-44.
25. Hyser, J.M., et al., *Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity*. MBio. 1(5).
26. Ciarlet, M., et al., *VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment*. J Virol, 2002. 76(3): p. 1109-23.
27. Ayala-Breton, C., et al., *Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference*. J Virol, 2009. 83(17): p. 8819-31.
28. Patton, J.T., *Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins*. J Gen Virol, 1995. 76 (Pt 11): p. 2633-44.
29. White, F.M., *Quantitative phosphoproteomic analysis of signaling network dynamics*. Curr Opin Biotechnol, 2008. 19(4): p. 404-9.
30. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. 411(6835): p. 355-65.
31. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. 7(2): p. 85-96.
32. Paradela, A. and J.P. Albar, *Advances in the analysis of protein phosphorylation*. J Proteome Res, 2008. 7(5): p. 1809-18.
33. Heilmann, A.M. and N.J. Dyson, *Phosphorylation puts the pRb tumor suppressor into shape*. Genes Dev. 26(11): p. 1128-30.
34. Hanks, S.K. and T. Hunter, *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification*. FASEB J, 1995. 9(8): p. 576-96.
35. Reinders, J. and A. Sickmann, *State-of-the-art in phosphoproteomics*. Proteomics, 2005. 5(16): p. 4052-61.
36. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. Science, 2002. 298(5600): p. 1912-34.
37. Smith, J.C. and D. Figeys, *Recent developments in mass spectrometry-based quantitative phosphoproteomics*. Biochem Cell Biol, 2008. 86(2): p. 137-48.
38. Kalume, D.E., H. Molina, and A. Pandey, *Tackling the phosphoproteome: tools and strategies*. Curr Opin Chem Biol, 2003. 7(1): p. 64-9.
39. Holloway, G. and B.S. Coulson, *Rotavirus activates JNK and p38 signaling pathways in intestinal cells, leading to AP-1-driven transcriptional responses and enhanced virus replication*. J Virol, 2006. 80(21): p. 10624-33.
40. Sen, A., et al., *The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3*. J Virol. 85(8): p. 3717-32.
41. Broquet, A.H., et al., *RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium*. J Immunol. 186(3): p. 1618-26.
42. Halasz, P., et al., *Rotavirus replication in intestinal cells differentially regulates integrin expression by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway, resulting in increased cell adhesion and virus yield*. J Virol, 2008. 82(1): p. 148-60.
43. Dutta, D., et al., *The molecular chaperone heat shock protein-90 positively regulates rotavirus infection*. Virology, 2009. 391(2): p. 325-33.

44. Rojas, M., C.F. Arias, and S. Lopez, *Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection*. J Virol. 84(20): p. 10457-66.
45. Montero, H., et al., *Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2alpha but prevents the formation of stress granules*. J Virol, 2008. 82(3): p. 1496-504.
46. Thingholm, T.E., O.N. Jensen, and M.R. Larsen, *Analytical strategies for phosphoproteomics*. Proteomics, 2009. 9(6): p. 1451-68.
47. Patton, W.F., *Detection technologies in proteome analysis*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. 771(1-2): p. 3-31.
48. Kaufmann, H., J.E. Bailey, and M. Fussenegger, *Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis*. Proteomics, 2001. 1(2): p. 194-9.
49. Bendt, A.K., et al., *Towards a phosphoproteome map of Corynebacterium glutamicum*. Proteomics, 2003. 3(8): p. 1637-46.
50. Orsatti, L., et al., *2-D Difference in gel electrophoresis combined with Pro-Q Diamond staining: a successful approach for the identification of kinase/phosphatase targets*. Electrophoresis, 2009. 30(14): p. 2469-76.
51. Miller, I., J. Crawford, and E. Gianazza, *Protein stains for proteomic applications: which, when, why?* Proteomics, 2006. 6(20): p. 5385-408.
52. Berwick, D.C. and J.M. Tavares, *Identifying protein kinase substrates: hunting for the organ-grinder's monkeys*. Trends Biochem Sci, 2004. 29(5): p. 227-32.
53. Simpson, R.J., *Proteins and Proteomics. A Laboratory Manual*. 2003, Cold Spring Harbor Laboratory Press (ed.): New York. p. 425-448, 597-667
54. Machida, M., et al., *Purification of phosphoproteins by immobilized metal affinity chromatography and its application to phosphoproteome analysis*. FEBS J, 2007. 274(6): p. 1576-87.
55. Dubrovskaya, A. and S. Souchelnytskyi, *Efficient enrichment of intact phosphorylated proteins by modified immobilized metal-affinity chromatography*. Proteomics, 2005. 5(18): p. 4678-83.
56. Ignatowski, K.M., *Immunoprecipitation and western blotting of phosphotyrosine-containing proteins*. Methods Mol Biol, 2001. 124: p. 39-48.
57. Sun, T., et al., *Preparation and application of antibodies to phosphoamino acid sequences*. Biopolymers, 2001. 60(1): p. 61-75.
58. Imam-Sghiouar, N., R. Joubert-Caron, and M. Caron, *Application of metal-chelate affinity chromatography to the study of the phosphoproteome*. Amino Acids, 2005. 28(1): p. 105-9.
59. Ficarro, S.B., et al., *Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to Saccharomyces cerevisiae*. Nat Biotechnol, 2002. 20(3): p. 301-5.
60. Thingholm, T.E. and O.N. Jensen, *Enrichment and characterization of phosphopeptides by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and mass spectrometry*. Methods Mol Biol, 2009. 527: p. 47-56, xi.
61. Zhang, Y., et al., *Time-resolved mass spectrometry of tyrosine phosphorylation sites in the epidermal growth factor receptor signaling network reveals dynamic modules*. Mol Cell Proteomics, 2005. 4(9): p. 1240-50.
62. Tsai, C.F., et al., *Immobilized metal affinity chromatography revisited: pH/acid control toward high selectivity in phosphoproteomics*. J Proteome Res, 2008. 7(9): p. 4058-69.

63. Pinkse, M.W., et al., *Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns*. *Anal Chem*, 2004. 76(14): p. 3935-43.
64. Larsen, M.R., et al., *Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns*. *Mol Cell Proteomics*, 2005. 4(7): p. 873-86.
65. Villen, J. and S.P. Gygi, *The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry*. *Nat Protoc*, 2008. 3(10): p. 1630-8.
66. Beausoleil, S.A., et al., *Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(33): p. 12130-5.
67. Oda, Y., T. Nagasu, and B.T. Chait, *Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome*. *Nat Biotechnol*, 2001. 19(4): p. 379-82.
68. McLachlin, D.T. and B.T. Chait, *Improved beta-elimination-based affinity purification strategy for enrichment of phosphopeptides*. *Anal Chem*, 2003. 75(24): p. 6826-36.
69. Zhou, H., J.D. Watts, and R. Aebersold, *A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation*. *Nat Biotechnol*, 2001. 19(4): p. 375-8.
70. Ong, S.E. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative*. *Nat Chem Biol*, 2005. 1(5): p. 252-62.
71. Ong, S.E., et al., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. *Mol Cell Proteomics*, 2002. 1(5): p. 376-86.
72. Mann, M., *Functional and quantitative proteomics using SILAC*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(12): p. 952-8.
73. Gruhler, A., et al., *Stable isotope labeling of Arabidopsis thaliana cells and quantitative proteomics by mass spectrometry*. *Mol Cell Proteomics*, 2005. 4(11): p. 1697-709.
74. Gygi, S.P., et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*. *Nat Biotechnol*, 1999. 17(10): p. 994-9.
75. Aggarwal, K., L.H. Choe, and K.H. Lee, *Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags*. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2006. 5(2): p. 112-20.
76. Sachon, E., et al., *Phosphopeptide quantitation using amine-reactive isobaric tagging reagents and tandem mass spectrometry: application to proteins isolated by gel electrophoresis*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006. 20(7): p. 1127-34.
77. Ross, P.L., et al., *Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents*. *Mol Cell Proteomics*, 2004. 3(12): p. 1154-69.
78. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
79. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-5.
80. Wang, Z., et al., *A simple and effective method for detecting phosphopeptides for phosphoproteomic analysis*. *J Proteomics*, 2009. 72(5): p. 831-5.
81. Jafri, M., et al., *MAPK signaling contributes to rotaviral-induced cholangiocyte injury and viral replication*. *Surgery*, 2007. 142(2): p. 192-201.
82. Casola, A., et al., *Interleukin-8 gene regulation in intestinal epithelial cells infected with rotavirus: role of viral-induced IkkappaB kinase activation*. *Virology*, 2002. 298(1): p. 8-19.
83. Blackhall, J., et al., *Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation*. *J Virol*, 1998. 72(8): p. 6398-405.

84. Guo, M., *WITHDRAWN: A Phosphoproteomics Strategy Compatible With Systems Biology Analysis*. Anal Biochem, 2009.
85. Yu, L.R., et al., *Improved titanium dioxide enrichment of phosphopeptides from HeLa cells and high confident phosphopeptide identification by cross-validation of MS/MS and MS/MS/MS spectra*. J Proteome Res, 2007. 6(11): p. 4150-62.
86. Bagchi, P., et al., *Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection*. J Virol. 84(13): p. 6834-45.
87. Ogawa, K., et al., *Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2009. 85(7): p. 217-28.
88. Samsa, M.M., et al., *Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation*. PLoS Pathog, 2009. 5(10): p. e1000632.
89. Cheung, W., et al., *Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasm, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication*. J Virol. 84(13): p. 6782-98.
90. Kim, Y. and K.O. Chang, *Inhibitory Effects of Bile Acids and Synthetic Farnesoid X Receptor Agonists on Rotavirus Replication*. J Virol.
91. Rossen, J.W., et al., *Inhibition of cyclooxygenase activity reduces rotavirus infection at a postbinding step*. J Virol, 2004. 78(18): p. 9721-30.
92. Martin-Latil, S., et al., *A cyclic AMP protein kinase A-dependent mechanism by which rotavirus impairs the expression and enzyme activity of brush border-associated sucrase-isomaltase in differentiated intestinal Caco-2 cells*. Cell Microbiol, 2004. 6(8): p. 719-31.
93. Sumbayev, V.V. and I.M. Yasinska, *Role of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in innate immune responses and viral infection*. Scand J Immunol, 2006. 63(6): p. 391-400.
94. Fernandez-Medarde, A. and E. Santos, *The RasGrf family of mammalian guanine nucleotide exchange factors*. Biochim Biophys Acta. 1815(2): p. 170-88.
95. Pierre, S., A.S. Bats, and X. Coumoul, *Understanding SOS (Son of Sevenless)*. Biochem Pharmacol. 82(9): p. 1049-56.
96. Beau, I., et al., *A protein kinase A-dependent mechanism by which rotavirus affects the distribution and mRNA level of the functional tight junction-associated protein, occludin, in human differentiated intestinal Caco-2 cells*. J Virol, 2007. 81(16): p. 8579-86.
97. Guttman, J.A. and B.B. Finlay, *Tight junctions as targets of infectious agents*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1788(4): p. 832-41.
98. Mandell, K.J. and C.A. Parkos, *The JAM family of proteins*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. 57(6): p. 857-67.
99. Tyler, K.L., et al., *Reoviruses and the host cell*. Trends Microbiol, 2001. 9(11): p. 560-4.
100. Forrest, J.C., et al., *Structure-function analysis of reovirus binding to junctional adhesion molecule 1. Implications for the mechanism of reovirus attachment*. J Biol Chem, 2003. 278(48): p. 48434-44.
101. Barton, E.S., et al., *Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus*. Cell, 2001. 104(3): p. 441-51.
102. Rhoads, J.M., et al., *Intestinal ribosomal p70(S6K) signaling is increased in piglet rotavirus enteritis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. 292(3): p. G913-22.
103. Jefferies, H.B., et al., *Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(10): p. 4441-5.
104. Rodriguez, L.S., et al., *Immunomodulators released during rotavirus infection of polarized caco-2 cells*. Viral Immunol, 2009. 22(3): p. 163-72.

105. Casola, A., et al., *Rotavirus infection of cultured intestinal epithelial cells induces secretion of CXC and CC chemokines*. *Gastroenterology*, 1998. 114(5): p. 947-55.
106. Xu, J., et al., *Rotavirus and coxsackievirus infection activated different profiles of toll-like receptors and chemokines in intestinal epithelial cells*. *Inflamm Res*, 2009. 58(9): p. 585-92.
107. Leonhardt, J., et al., *Gene expression profile of the infective murine model for biliary atresia*. *Pediatr Surg Int*, 2006. 22(1): p. 84-9.
108. Martin, D., et al., *Sequestration of free tubulin molecules by the viral protein NSP2 induces microtubule depolymerization during rotavirus infection*. *J Virol*. 84(5): p. 2522-32.
109. Yang, W. and M.A. McCrae, *The rotavirus enterotoxin (NSP4) promotes re-modeling of the intracellular microtubule network*. *Virus Res*.
110. Kardon, J.R. and R.D. Vale, *Regulators of the cytoplasmic dynein motor*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. 10(12): p. 854-65.
111. Schroer, T.A., *Dynactin*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004. 20: p. 759-79.

10. Apéndice

Método de Fragmentación

El tiempo de corrida fue de 120 min y el método construido para el análisis consta de 2 segmentos. El segmento 1 tiene una duración de 0.1 min/1 solo scan/tune method: Default_ESI_IBT. Scan event details 1: ITMS + c norm o E (300.00-2000.0). CV= 0.0V.

Segmento 2

Duration time: 119.90 min

Number of scan events: 7

Tune method: Default_ESI_IBT

Scan event details:

1: FMTS + c norm res=3000 o (300.00-2000.0)

CV = 0.0V

2: FMTS + c norm res=3000 Dep MS/MS Most intense ion from (1)

Activation Type: HCD

Min. Signal Required: 500.0

Isolation width: 3.00

Normalized Coll. Energy: 35.0

Default Charge State: 2

Activation Time: 30.000

CV = 0.0V

3: FMTS + c norm res=3000 Dep MS/MS Most intense ion from (1)

Activation Type: CID

Min. Signal Required: 500.0

Isolation width: 3.00

Normalized Coll. Energy: 35.0

Default Charge State: 2

Activation Q: 0.250

Activation Time: 30.000

CV = 0.0V

4: FMTS + c norm res=3000 Dep MS3 Neutral Loss from (3)

Activation Type: CID

Min. Signal Required: 500.0

Isolation width: 3.00

Normalized Coll. Energy: 35.0

Default Charge State: 2

Activation Q: 0.250

Activation Time: 30.000

CV = 0.0V

5: FMTS + c norm res=3000 Dep MS/MS 2nd most intense ion from (1)

Activation Type: HCD

Min. Signal Required: 500.0

Isolation width: 3.00

Normalized Coll. Energy: 35.0

Default Charge State: 2

Activation Time: 30.000

CV = 0.0V

6: FMTS + c norm res=3000 Dep MS/MS 2nd most intense ion from (1)

Activation Type: CID

Min. Signal Required: 500.0

Isolation width: 3.00

Normalized Coll. Energy: 35.0

Default Charge State: 2

Activation Q: 0.250

Activation Time: 30.000

CV = 0.0V

7: FMTS + c norm res=3000 Dep MS3 Neutral loss from (6)

Activation Type: CID

Min. Signal Required: 500.0

Isolation width: 3.00

Normalized Coll. Energy: 35.0

Default Charge State: 2

Activation Q: 0.250

Activation Time: 30.000

CV = 0.0V

Por otro lado, se establecieron masas que se rechazaron del análisis ya que están siempre presentes como fondo del equipo. Y para ello se hizo como sigue:

Data dependent settings:

Use separate polarity settings disabled

Parent mass list: (None)

Reject mass list: 419.31, 429.09, 445.12, 462.14, 476.20, 503.1, 519.14, 536.16, 550.21, 593.15, 610.18, 624.23, 667.17, 684.20, 698.25, 758.21, 772.26, 832.23, 906.25.

De igual forma, se establecieron las masas de las pérdidas neutrales de los grupos fosfato dependiendo de la carga del péptido (se excluyen péptidos de carga +4 en adelante) durante la fragmentación. Para que cuando sean detectadas estas pérdidas se accione el MS3 que terminara de secuenciar el péptido y ayudara a determinar el sitio de fosforilación. La lista se hizo como sigue:

Neutral loss mass list:

Mass	Name
26.65	carga 3
32.65	carga 3
39.95	carga 2
48.98	carga 2
53.31	carga 3
65.32	carga 3
79.97	carga 1
97.96	carga 1
159.94	carga 1

Tabla 1. Fosfoproteínas que cambian durante la infección

ID Gen Humano	Descripción	117/116 (6 hpi)	115/114 (2hpi)
5923	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1 isoform 1 [Homo sapiens]	2.023	1.143
7273	titin isoform N2-A [Homo sapiens]	3.213	1.527
8899	serine/threonine-protein kinase PRP4K [Homo sapiens]	2.252	1.459
169044	collagen, type XXII, alpha 1 [Homo sapiens]	3.213	1.527
79960	Jade1 protein long isoform [Homo sapiens]	2.252	1.459
23082	PGC-1 related co-activator [Homo sapiens]	X	X
92714	arrestin domain containing 1 [Homo sapiens]	2.524	1.319
652642	PREDICTED: similar to a disintegrin and metalloprotease domain 3 (cyritestin) [Homo sapiens]	2.252	1.459
8777	multiple PDZ domain protein [Homo sapiens]	2.252	1.459
344905	ATPase type 13A5 [Homo sapiens]	2.023	1.143
90102	pleckstrin homology-like domain, family B, member 2 [Homo sapiens]	2.252	1.459
56479	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 5 [Homo sapiens]	3.629	0.862
4288	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 [Homo sapiens]	3.213	1.527
3155	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylglutaricaciduria) [Homo sapiens]	3.181	1.212
57509	mitochondrial tumor suppressor 1 isoform 1 [Homo sapiens]	3.213	1.527
10868	ubiquitin specific protease 20 [Homo sapiens]	ND	2.426
254173	tubulin tyrosine ligase-like family, member 10 [Homo sapiens]	2.079	0.486
3822	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2 [Homo sapiens]	0.527	1.639
55870	ash1 (absent, small, or homeotic)-like [Homo sapiens]	2.01	1.613
10564	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 [Homo sapiens]	2.62	0.893
339829	PREDICTED: hypothetical protein LOC339829 [Homo sapiens]	3.818	1.01
51306	chromosome 5 open reading frame 5 [Homo sapiens]	2.863	0.782
57647	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 37 [Homo sapiens]	3.181	1.212
23312	Dmx-like 2 [Homo sapiens]	2.348	1.23
10311	Down syndrome critical region protein 3 [Homo sapiens]	3.629	0.862
131177	family with sequence similarity 3, member D [Homo sapiens]	2.207	0.91
2157	coagulation factor VIII isoform a precursor [Homo sapiens]	2.511	2.262
2803	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4 [Homo sapiens]	X	X
3053	heparin cofactor II precursor [Homo sapiens]	0.396	1.079
147700	kinesin light chain 3 [Homo sapiens]	2.506	1.106
23513	scribble isoform b [Homo sapiens]	2.863	0.782
4204	methyl CpG binding protein 2 [Homo sapiens]	X	X
4603	PREDICTED: v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1 isoform 1 [Homo sapiens]	3.686	1.496
4642	myosin ID [Homo sapiens]	2.001	ND
5291	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide [Homo sapiens]	2.863	0.782

10216	proteoglycan 4 [Homo sapiens]	2.884	1.286
440533	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 8 [Homo sapiens]	X	X
158	adenylosuccinate lyase [Homo sapiens]	2.884	1.286
54517	pseudouridylate synthase 7 homolog [Homo sapiens]	7.703	0.968
266747	Ral-GDS related protein Rgr [Homo sapiens]	2.176	1.282
6430	splicing factor, arginine/serine-rich 5 [Homo sapiens]	2.884	1.286
6654	son of sevenless homolog 1 [Homo sapiens]	2.7	1.534
3371	tenascin C (hexabrachion) [Homo sapiens]	X	X
10054	SUMO-1 activating enzyme subunit 2 [Homo sapiens]	2.252	1.459
80724	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 10 [Homo sapiens]	ND	2.259
51411	bridging integrator 2 [Homo sapiens]	3.181	1.212
65250	hypothetical protein LOC65250 [Homo sapiens]	2.469	1.132
54906	PREDICTED: hypothetical protein LOC54906 isoform 1 [Homo sapiens]	0.527	1.639
49860	hypothetical protein LOC49860 [Homo sapiens]	X	X
196296	FLJ46154 protein [Homo sapiens]	2.155	1.049
115361	guanylate binding protein 4 [Homo sapiens]	2.107	1.528
145741	nuclear localized factor 1 [Homo sapiens]	2.167	0.919
9180	oncostatin M receptor [Homo sapiens]	3.629	0.862
23037	PDZ domain containing 2 [Homo sapiens]	1.348	2.404
55276	phosphoglucomutase 2 [Homo sapiens]	3.629	0.862
399744	hypothetical protein LOC399744 [Homo sapiens]	2.207	0.91
29104	HemK methyltransferase family member 2 isoform 2 [Homo sapiens]	X	X
51149	hypothetical protein LOC51149 isoform 1 [Homo sapiens]	1.971	2.785
256085	PREDICTED: similar to Tryptophan-rich protein (Congenital heart disease 5 protein) [Homo sapiens]	0.527	1.639
23269	PREDICTED: MAX dimerization protein 5 isoform 1 [Homo sapiens]	1.45	0.507
4957	outer dense fiber of sperm tails 2 isoform 1 [Homo sapiens]	2.695	1.165
79659	PREDICTED: dynein, cytoplasmic, heavy polypeptide 2 isoform 1 [Homo sapiens]	2.348	1.068
5982	replication factor C 2 (40kD) isoform 2 [Homo sapiens]	3.181	1.212
650293	seven transmembrane helix receptor [Homo sapiens]	3.629	0.862
389842	PREDICTED: similar to Ran-specific GTPase-activating protein (Ran binding protein 1) [Homo sapiens]	2.884	1.286
206338	laeverin [Homo sapiens]	3.629	0.862
1565	cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6 isoform 2 [Homo sapiens]	2.363	0.738
649264	PREDICTED: similar to cauxin [Homo sapiens]	1.348	2.404
3631	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type 1 isoform a [Homo sapiens]	2.108	0.682
648278	PREDICTED: similar to Kelch-like protein 2 [Homo sapiens]	X	X
650998	PREDICTED: similar to zinc finger homeobox 1b [Homo sapiens]	3.629	0.862
51306	PREDICTED: similar to CG4841-PA isoform 10 [Homo sapiens]	2.256	2.056
4645	PREDICTED: similar to Myosin-5B (Myosin Vb) isoform 6 [Homo sapiens]	X	X
10216	microtubule associated serine/threonine kinase 2 [Homo sapiens]	3.181	1.212
25966	chromosome 21 open reading frame 25 [Homo sapiens]	2.155	1.049
653987	PREDICTED: hypothetical protein XP_942656 [Homo sapiens]	3.629	0.862
222521	hypothetical protein LOC222521 [Homo sapiens]	2.165	0.928

647050	PREDICTED: hypothetical protein XP_939336 [Homo sapiens]	2.766	1.184
120425	adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1 [Homo sapiens]	18.769	2.339
81624	diaphanous homolog 3 [Homo sapiens]	3.686	1.496
540	ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide isoform b [Homo sapiens]	0.527	1.639
23331	PREDICTED: hypothetical protein LOC23331 [Homo sapiens]	2.311	ND
9605	chromosome 16 open reading frame 7 [Homo sapiens]	X	X
79747	PREDICTED: hypothetical protein LOC79747 isoform 3 [Homo sapiens]	X	X
57711	zinc finger protein 529 [Homo sapiens]	3.629	0.862
158427	hypothetical protein LOC158427 [Homo sapiens]	3.629	0.862
323	amyloid beta A4 precursor protein-binding, family B, member 2 [Homo sapiens]	2.207	0.91
10529	nebulette sarcomeric isoform [Homo sapiens]	0.527	1.639
646670	PREDICTED: similar to COMM domain containing 4 [Homo sapiens]	2.564	1.283
1373	carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial [Homo sapiens]	3.818	1.010
116328	PREDICTED: uncharacterized protein C8orf34-like [Macaca mulatta]	3.629	0.862
7290	PREDICTED: protein HIRA-like isoform 2 [Macaca mulatta]	3.213	1.527
91664	PREDICTED: zinc finger protein 845-like, partial [Macaca mulatta]	2.023	1.143
158158	PREDICTED: ras and EF-hand domain-containing protein-like [Macaca mulatta]	2.252	1.459
6574	PREDICTED: sodium-dependent phosphate transporter 1-like isoform 6 [Macaca mulatta]	2.252	1.459
148870	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 27 isoform 2 [Macaca mulatta]	2.863	0.782
8214	PREDICTED: protein DGCR6-like [Macaca mulatta]	2.252	1.459
168975	PREDICTED: cyclic nucleotide-binding domain-containing protein 1-like [Macaca mulatta]	2.252	1.459
9884	PREDICTED: leucine-rich repeat-containing protein 37A-like [Macaca mulatta]	3.213	1.527
7597	PREDICTED: zinc finger and BTB domain-containing protein 25-like isoform 2 [Macaca mulatta]	2.252	1.459
7639	PREDICTED: zinc finger protein 85-like [Macaca mulatta]	2.207	0.91
202333	PREDICTED: cardiomyopathy-associated protein 5-like [Macaca mulatta]	2.001	2.785
23139	PREDICTED: microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2 isoform 9 [Macaca mulatta]	3.181	1.212
57147	PREDICTED: protein-associating with the carboxyl-terminal domain of ezrin isoform 4 [Macaca mulatta]	2.155	1.049
7037	PREDICTED: transferrin receptor protein 1 isoform 3 [Macaca mulatta]	1.183	2.407
26173	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: integrator complex subunit 1-like [Macaca mulatta]	2.252	1.459
221264	PREDICTED: uncharacterized protein C6orf224-like [Macaca mulatta]	2.165	0.928
6870	NK-3 receptor [Macaca mulatta]	X	X
84162	PREDICTED: uncharacterized protein KIAA1109-like [Macaca mulatta]	2.256	2.056
51780	PREDICTED: lysine-specific demethylase 3B-like [Macaca mulatta]	2.252	1.459
64411	PREDICTED: arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein [Macaca mulatta]	1.348	2.404
No hallado	PREDICTED: hypothetical protein LOC100430768 [Macaca mulatta]	X	X
11083	PREDICTED: death-inducer obliterator 1 isoform 1 [Macaca mulatta]	X	X
23532	PREDICTED: melanoma antigen preferentially expressed in tumors isoform 1 [Macaca m	2.473	1.256
5288	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 do	0.527	1.639
338773	PREDICTED: transmembrane protein 119-like [Macaca mulatta]	3.181	1.212
9735	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: kinetochore-associated protein 1-like [Macaca	0.527	1.639
7173	PREDICTED: thyroid peroxidase [Macaca mulatta]	2.595	1.45

23513	PREDICTED: hypothetical protein LOC702716 [Macaca mulatta]		2.207	0.91
4867	PREDICTED: nephrocystin-1-like isoform 1 [Macaca mulatta]		2.207	0.91
4723	PREDICTED: NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial-like [Macaca mulatta]	X		X
54801	PREDICTED: HAUS augmin-like complex subunit 6-like [Macaca mulatta]		3.629	0.862
79915	PREDICTED: ATPase family AAA domain-containing protein 5-like [Macaca mulatta]		11.275	1.452
10208	PREDICTED: ubiquitin-specific peptidase-like protein 1-like [Macaca mulatta]		0.396	1.079
63895	PREDICTED: protein FAM38A-like [Macaca mulatta]		ND	2.259
5932	PREDICTED: retinoblastoma-binding protein 8 [Macaca mulatta]		2.863	0.782
84444	PREDICTED: histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific isoform 1 [Macaca mulatta]		3.181	1.212
94025	PREDICTED: mucin-16-like, partial [Macaca mulatta]		2.207	0.91
100049587	PREDICTED: sialic acid-binding Ig-like lectin 14-like [Macaca mulatta]	X		X
221223	carboxylesterase 7 [Macaca mulatta]		1.348	2.404
347365	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5-like [Macaca mulatta]		2.157	1.217

X= etiqueta detectada solo en la condición de infección; ND= Etiqueta no detectada en ninguna condición; No hallado= no se encontró proteína homóloga de Macaca en humano; 117/116= abundancia de la proteína a las 6 hpi; 115/114= abundancia de la proteína a las 2 hpi.

Tabla 2. Proteínas no fosforiladas que cambian durante la infección

ID Gen Humano	Descripción	117/116 (6hpi)	115/114 (2hpi)
57092	PEST-containing nuclear protein [Homo sapiens]	2.023	1.143
401024	FLJ44048 protein [Homo sapiens]	3.213	1.527
132332	hypothetical protein LOC132332 [Homo sapiens]	2.079	0.486
5603	mitogen-activated protein kinase 13 [Homo sapiens]	2.079	0.486
4026	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma [Homo sapiens]	2.863	0.782
123720	PREDICTED: similar to junction-mediating and regulatory protein [Homo sapiens]	2.306	0.738
26005	hypothetical protein LOC26005 [Homo sapiens]	3.213	1.527
1639	dynactin 1 isoform 2 [Homo sapiens]	26.762	2.947
155	adrenergic, beta-3-, receptor [Homo sapiens]	3.879	0.763
100499483	hypothetical protein LOC57653 [Homo sapiens]	2.148	1.045
489	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase isoform f [Homo sapiens]	2.004	1.570
92196	hypothetical protein LOC92196 [Homo sapiens]	0.792	2.661
3069	high density lipoprotein binding protein [Homo sapiens]	2.016	1.061
29117	bromodomain containing 7 [Homo sapiens]	2.165	0.928
953	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 [Homo sapiens]	2.977	1.378
8820	homeo box (expressed in ES cells) 1 [Homo sapiens]	2.165	0.928
57639	hypothetical protein LOC57639 [Homo sapiens]	1.682	0.476
23191	cytoplasmic FMR1 interacting protein 1 isoform a [Homo sapiens]	2.541	0.527
440107	hypothetical protein LOC440107 [Homo sapiens]	3.755	0.672

23225	nucleoporin 210 [Homo sapiens]	2.538	1.824
8227	DNA segment on chromosome X and Y (unique) 155 expressed sequence [Homo sapiens]	2.541	0.527
55164	SHQ1 homolog [Homo sapiens]	2.148	1.045
375248	PREDICTED: similar to protein immuno-reactive with anti-PTH polyclonal antibodies [Homo sapiens]	2.178	0.673
26582	PREDICTED: similar to double homeobox 4c [Homo sapiens]	3.518	0.946
5069	PREDICTED: hypothetical protein XP_939028 [Homo sapiens]	2.700	1.327
3627	small inducible cytokine B10 precursor [Homo sapiens]	2.165	0.928
94025	mucin 16 [Homo sapiens]	2.441	1.496
388817	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like [Macaca mulatta]	0.527	1.639
5478	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like [Macaca mulatta]	0.542	3.026
4026	PREDICTED: lipoma-preferred partner-like isoform 2 [Macaca mulatta]	2.863	0.782
26005	PREDICTED: c2 domain-containing protein 3-like isoform 2 [Macaca mulatta]	3.213	1.527
1639	PREDICTED: dynactin subunit 1-like isoform 1 [Macaca mulatta]	26.762	2.947
7752	PREDICTED: zinc finger protein 200 isoform 1 [Macaca mulatta]	0.396	1.079
1062	PREDICTED: centromere-associated protein E-like isoform 1 [Macaca mulatta]	26.762	2.947
136306	PREDICTED: putative transporter SVOPL-like [Macaca mulatta]	2.947	1.140
155	beta-3 adrenergic receptor [Macaca mulatta]	3.879	0.763
489	PREDICTED: sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3 isoform 2 [Macaca mulatta]	2.004	1.570
92196	PREDICTED: death associated protein-like 1 [Macaca mulatta]	0.792	2.661
3069	PREDICTED: vigilin-like [Macaca mulatta]	2.016	1.061
6847	PREDICTED: synaptonemal complex protein 1-like isoform 3 [Macaca mulatta]	2.339	1.273
3627	C-X-C motif chemokine 10 precursor [Macaca mulatta]	2.165	0.928
1350	PREDICTED: cytochrome c oxidase subunit 7C, mitochondrial-like [Macaca mulatta]	2.050	0.902
1401	PREDICTED: c-reactive protein isoform 2 [Macaca mulatta]	2.363	0.738
55164	PREDICTED: protein SHQ1 homolog isoform 2 [Macaca mulatta]	2.148	1.045
8820	PREDICTED: homeobox expressed in ES cells 1 isoform 1 [Macaca mulatta]	2.165	0.928
285313	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: immunoglobulin superfamily member 10-like [Macaca mulatta]	6.328	1.535
64792	PREDICTED: rab-like protein 5-like isoform 1 [Macaca mulatta]	2.306	0.738
9865	PREDICTED: leucine-rich repeat-containing protein KIAA0644-like [Macaca mulatta]	7.703	0.968
23191	PREDICTED: cytoplasmic FMR1-interacting protein 1-like isoform 1 [Macaca mulatta]	2.541	0.527
288	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: ankyrin-3-like [Macaca mulatta]	1.330	4.235
953	PREDICTED: ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 isoform 2 [Macaca mulatta]	2.977	1.378
1915	PREDICTED: elongation factor 1-alpha 2-like isoform 4 [Macaca mulatta]	2.620	0.893
6431	PREDICTED: hypothetical protein LOC696054 [Macaca mulatta]	3.181	1.212
79980	PREDICTED: kinetochore-associated protein DSN1 homolog isoform 2 [Macaca mulatta]	2.863	0.782
440107	PREDICTED: pleckstrin homology domain-containing family G member 7-like [Macaca mulatta]	3.755	0.672
29117	PREDICTED: bromodomain-containing protein 7 isoform 2 [Macaca mulatta]	2.165	0.928

117/116= abundancia de la proteína a las 6 hpi; 115/114= abundancia de la proteína a las 2 hpi.