



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Identificación de proteínas celulares importantes  
en el ciclo de replicación de astrovirus

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

**MARÍA ANDREA MURILLO GALLO**

TUTOR PRINCIPAL

DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ (IBT-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ROSARIO VERA-ESTRELLA (IBT-UNAM)

DR. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA (IBT-UNAM)

DR. RAMÓN GONZÁLEZ GARCÍA CONDE (CIDC-UAEM)

CUERNAVACA, MORELOS. noviembre, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

El presente trabajo de tesis fue realizado en el laboratorio de los doctores Carlos F. Arias y Susana López, perteneciente al Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. La dirección del mismo estuvo bajo la tutela del Dr. Carlos F. Arias Ortiz.

El proyecto de tesis fue desarrollado con los donativos CB07-79574 y P-178232 de CONACYT y el donativo IN219910 de DGAPA- UNAM, durante la realización del mismo también se contó con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México.

Comité tutor:

Dra. Rosario Vera-Estrella

Dr. Enrique Rudiño Piñera

Dr. Ramón González García Conde

Jurado de examen de grado:

Dr. José Luis Reyes Taboada

Dra. Celina García Meléndez

Dra. Victoria Pando Robles

Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

Dr. Juan Santiago Salas-Benito

**DEDICADO A**

*Myriam y Raúl, mis padres.  
Aarón, mi amoroso esposo,  
Ernesto, científico, maestro y ejemplo a seguir.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Carlos Arias, mi tutor, por sus enseñanzas, por el tiempo dedicado a este trabajo, por enseñarme a creer en mi, a ser crítica, a hacer las cosas bien y por aumentar mi amor por la ciencia.

A Susana López, por sus recomendaciones, sugerencias, críticas y apoyo durante mi trabajo de tesis.

A CONACYT por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

A los doctores Rosario Vera-Estrella, Ramón González Gacía Conde, Enrique Rudiño, miembros del comité tutorial, por acompañarme y guiarme con críticas, y sugerencias durante mi doctorado, por su tiempo y dedicación, gracias.

A los doctores José Luis Reyes Taboada, Celina García Meléndez, Victoria Pando Robles, Fernando Esquivel Guadarrama y Juan Santiago Salas-Benito jurados del trabajo de tesis por su exhaustiva lectura, por sus correcciones y sugerencias.

A todos los miembros de laboratorio Arias López, por tantos años compartidos, por la alegría de trabajar en su compañía, por hacer cada día en el lab un día más en familia.

A Pedrito, por regalarme su compañía, sus enseñanzas, sus sonrisas cada día.

A Ernesto, por creer en mi, por enseñarme el quehacer científico, por permitirme ser parte de su grupo y por haber compartido los días de trabajo antes de su pronta partida.

A mi familia, por apoyarme en este sueño, por estar a mi lado brindándome tanto amor.

A mi esposo, Aarón, compañero de vida y de pensamiento, por sus críticas y aportes a este trabajo, por su amorosa y dedicada compañía y por hacer del día a día un experiencia maravillosa.



## TABLA DE CONTENIDO

1. Lista de Abreviaturas	5
2. Lista de figuras	9
2.1. Lista de figuras de la introducción	
2.2. Lista de figuras de los resultados	
3. Lista de tablas	12
3.1. Lista de tablas de la introducción	
3.2. Lista de tablas de los resultados	
4. Resumen	13
5. Abstract	15
6. Introducción	17
6.1. Astrovirus	17
6.1.1. Familia Astroviridae	17
6.1.2. Astrovirus humanos	18
6.2. Componentes estructurales de astrovirus y sus funciones	20
6.2.1. Genoma	20
6.2.2. Proteínas no estructurales	22
6.2.3. Proteína estructural	22
6.2.4. Ciclo de replicación de astrovirus	24
6.3. Cambios morfológicos y bioquímicos en la célula inducidos por virus con genoma de RNA de polaridad positiva [(+)RNA]	28
6.3.1. Modificaciones de las membranas intracelulares	29
6.3.1.1. Vesículas invaginadas - Esférulas	30
6.3.1.2. Estructuras de doble membrana	31
6.3.2. Factores celulares usados por los virus (+)RNA	34
6.4. Separación de proteínas asociadas a membranas por gradientes de iodixanol	37
6.4.1. Iodixanol (OPTIPREP)	37
6.4.2. Electroforesis zonal de flujo libre (FFZE)	38

---

7. Antecedentes	43
8. Justificación	45
9. Hipótesis	45
10. Objetivos	46
11. Materiales y Métodos	
11.1. Células y virus	47
11.2. Anticuerpos y reactivos	47
11.3. Ensayo de infectividad	47
11.4. Ensayo de rendimiento viral	48
11.5. Fraccionamiento celular	48
11.6. Separación de membranas por Electroforesis Zonal de Flujo Libre (FFZE)	49
11.7. Detección de proteínas por ensayo ELISA	50
11.8. Inmunoblots	51
11.9. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)	51
11.10. Búsqueda en las bases de datos	53
11.11. Criterios para la identificación de proteínas	53
11.12. Construcción y análisis de redes de interacción proteína-proteína	54
11.13. Transfección de RNA pequeños de interferencia (siRNA)	54
11.14. Análisis de RNA viral	54
11.15. Ensayos de PCR cuantitativo (qRT-PCR)	55
11.16. Microscopía electrónica	55
11.17. Inmunomicroscopía electrónica	56
12. Resultados	57
12.1. Obtención de proteínas asociadas a membranas de las células Caco-2 infectadas con astrovirus Yuc8	57
12.1.1. Separación de las proteínas asociadas a membrana	



---

mediante gradientes de densidad en iodixanol	57
12.1.2. Fraccionamiento de las proteínas asociadas a membrana mediante electroforesis zonal de flujo libre (FFZE)	57
12.1.3. Evaluación de la presencia de componentes de astrovirus Yuc8 en las poblaciones de membrana separadas por FFZE	59
12.1.4. Evaluación de la presencia de las proteínas virales en las fracciones de membrana separadas por FFZE	60
12.1.5. Evaluación de la presencia del RNA viral en las fracciones de membrana separadas por FFZE	63
12.1.6. Evaluación de la presencia de partículas virales infecciosas en las fracciones de membrana separadas por FFZE	64
12.2. Estudio preliminar de la localización de la RNA polimerasa de astrovirus Yuc8 por microscopía electrónica	65
12.3. Análisis por espectrometría de masas de las fracciones separadas por FFZE	67
12.3.1. Identificación de proteínas celulares por espectrometría de masas (LC-MS/MS)	67
12.3.2. Distribución de las proteínas celulares en las tres poblaciones de membrana	68
12.3.3. Identificación de proteínas virales por espectrometría de masas (LC-MS/MS)	71
12.4. Análisis proteómico de las poblaciones de membranas separadas de células Caco-2 infectadas con astrovirus	71

---

12.4.1. Análisis funcional de las proteínas celulares totales	72
12.4.2. Análisis funcional de las proteínas celulares en las tres poblaciones de membrana	77
12.4.3. Análisis de las proteínas en las fracciones donde se encontró a astrovirus	80
12.5. Efecto de la disminución de la síntesis de proteínas de la fracción 48-49 por interferencia del RNA sobre la replicación de astrovirus	82
12.6. Análisis de los marcadores de organelos en las poblaciones de membranas separadas de células Caco-2 infectadas con astrovirus	86
13. Discusión	91
14. Conclusiones	99
15. Perspectivas	100
16. Referencias	101
17. Tablas Anexas	111
18. Anexo 1 (artículo)	113

---

## 1. LISTA DE ABREVIATURAS

<b>(+)RNA</b>	Virus con genoma de RNA de polaridad positiva
<b>ARF6</b>	Factor de ribosilación ADP 6 (del inglés: ADP-ribosylation factor 6)
<b>ARL1</b>	Proteína similar al factor de ribosilación ADP 1 (del inglés: ADP-ribosylation factor-like protein 1)
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de calcio
<b>Caco-2</b>	Línea celular de cáncer de colon humano
<b>CDS2</b>	(Fosfatidato citidil transferasa 2 isoforma 1 (del inglés: Isoform 1 of Phosphatidate cytidyltransferase 2 )
<b>CVB3</b>	Coxsackie virus quimérico 3 (del inglés: Chimeric coxsackie B3 virus)
<b>CYP51A1</b>	Isoforma 1 de la lanosterol demetilasa 14-alfa (del inglés: lanosterol 14-alpha demethylase isoform 1) Nombre del gen: Cytochrome P450 51A1
<b>DDX23</b>	Probable helicasa de RNA DDX23 dependiente de ATP (del inglés: Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23)
<b>DENV</b>	Dengue virus
<b>DHCR7</b>	7-Dehidrocolesterol reductasa (del inglés: 7-dehydrocholesterol reductase)
<b>DMEM</b>	Medio Dulbecco Eagle modificado (del inglés: DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium)
<b>EIF6</b>	Factor de inicio de la traducción eucariote 6 (del inglés: Eukaryotic translation initiation factor 6)
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
<b>FASN</b>	Sintasa de ácidos grasos (del inglés: Fatty acid synthase)
<b>FFZE</b>	del inglés: Free Flow Zonal Electrophoresis
<b>FHV</b>	Flock house virus

---

<b>GO</b>	Gene Ontology
<b>HAstV</b>	Astrovirus Humano
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HCV</b>	Virus de Hepatitis C
<b>HMO</b>	Astrovirus (del inglés: Human-Mink-Ovine)
<b>hpi</b>	Horas post-infección
<b>hpt</b>	Horas post-transfección
<b>Irr</b>	Irrelevante, siRNA usado como control el cuál no tiene gen blanco en la célula
<b>ITPR3</b>	Receptor tipo 3 del inositol 1,4,5-trifosfato (del inglés: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3)
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
<b>MEM</b>	Medio mínimo esencial (del inglés: Minimum Essential Medium Eagle)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>MLB1</b>	Astrovirus humano aislado de un niño en Melbourne
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección (del inglés: Multiplicity of infection)
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>OsO<sub>4</sub></b>	Tetróxido de osmio
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino (del inglés phosphate buffered saline)
<b>PBS-BSA</b>	Tampón fosfato salino y albumina bovina (del inglés phosphate buffered saline -Bovine Serum Albumine)

---

---

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: polymerase chain reaction)
<b>PI4KIII A</b>	Fosfatidil inositol 4-cinasa alfa (del inglés: phosphatidylinositol 4-kinase alpha)
<b>PI4KIII B</b>	Fosfatidil inositol 4-cinasa beta (del inglés: phosphatidylinositol 4-kinase beta)
<b>PV</b>	Poliovirus
<b>RdRp</b>	RNA polimerasa dependiente de RNA
<b>RNAag</b>	RNA antigenómico (-)
<b>RNAg</b>	RNA genómico (+)
<b>RNAsg</b>	RNA subgenómico
<b>RUBV</b>	Virus de la rubeola (del inglés: Rubella virus)
<b>SARS-CoV</b>	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo (del inglés: severe acute respiratory syndrome)
<b>SDS-PAGE</b>	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (del inglés: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
<b>SFV</b>	Semliki forest virus
<b>siRNA</b>	RNA de interferencia pequeño (del inglés: small interference RNA)
<b>TBS-T</b>	Tampón salino de Tris (del inglés: Tris-buffered saline)
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TMBV</b>	Virus del mosaico del tabaco (Tobacco mosaic virus)
<b>TBSV</b>	Virus del enanismo del tomate (Tomato bushy stunt virus)
<b>TRAIL</b>	Ligando inductor de la apoptosis relacionado a TNF (del inglés: TNF-related apoptosis-inducing ligand)
<b>Tris-EDTA</b>	Tri (hidroximetil) aminometano - Ácido etilendiaminotetraacético

---

<b>VA1</b>	Astrovirus humano VA1
<b>WNV</b>	Virus del oeste del Nilo (West Nile Virus)
<b>YFV</b>	Virus de la fiebre amarilla (Yellow Fever Virus)
<b>Yuc8</b>	Astrovirus Humano cepa Yuc8
<b>Z-VAD-fmk</b>	N-benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp(O-Me) fluorometil cetona (del inglés: N-Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone Inhibidor general de caspasas

---

## 2. LISTA DE FIGURAS

### 2.1. Lista de figuras de la introducción

<b>Figura I.1</b>	Árbol filogenético de astrovirus humanos	20
<b>Figura I.2</b>	Estructura del genoma de astrovirus	21
<b>Figura I.3</b>	Proteínas no estructurales de astrovirus	23
<b>Figura I.4</b>	Proteína estructural de astrovirus	24
<b>Figura I.5</b>	Ciclo de replicación de astrovirus	25
<b>Figura I.6</b>	Cinética de la síntesis de RNA genómico y antigenómico de astrovirus	26
<b>Figura I.7</b>	Ciclo de replicación de virus RNA(+)	29
<b>Figura I.8</b>	Organelos utilizados por diferentes virus RNA(+) para remodelar sus membranas y generar fábricas de replicación	30
<b>Figura I.9</b>	Clasificación de las estructuras de membranas generadas por virus RNA (+)	32
<b>Figura I.10</b>	Rearreglos de membrana inducidos por virus RNA (+)	33
<b>Figura I.11</b>	Estructura del iodixanol	39
<b>Figura I.12</b>	Equipo de electroforesis de flujo libre (BD Proteomics)	42
<b>Figura I.13</b>	Modos de operación de la electroforesis de flujo libre	43

---

## 2.2. Lista de figuras de los resultados

<b>Figura II.1</b>	Separación de proteínas asociadas a membranas.	59
<b>Figura II.2</b>	Separación de las membranas de células Caco-2 por electroforesis zonal de flujo libre (FFZE).	60
<b>Figura II.3</b>	Inmunodetección de antígenos virales en las fracciones FFZE.	62
<b>Figura II.4</b>	Detección de las proteínas virales en las fracciones FFZE.	63
<b>Figura II.5</b>	Detección del RNA viral en las fracciones FFZE.	64
<b>Figura II.6</b>	Detección de partículas virales infecciosas en las fracciones FFZE.	65
<b>Figura II.7</b>	Microscopía electrónica de células infectadas con astrovirus Yuc8.	67
<b>Figura II.8</b>	Diagrama de flujo del análisis por espectrometría de masas.	70
<b>Figura II.9</b>	Diagrama de Venn de proteínas totales.	70
<b>Figura II.10</b>	Diagrama de Venn de proteínas por población de membranas.	71
<b>Figura II.11</b>	Redes de interacción proteína-proteína.	74
<b>Figura II.12</b>	Comparación entre la red de interacción de proteínas de las células infectadas y no infectadas.	77
<b>Figura II.13</b>	Diagramas de Venn que muestran las anotaciones GO comunes entre las condiciones de células infectadas y no infectadas para las poblaciones I, III y población II.	80
<b>Figura II.14</b>	Viabilidad de las células transfectadas y eficiencia del silenciamiento.	84
<b>Figura II.15</b>	Efecto del silenciamiento de los genes celulares seleccionados sobre el rendimiento viral.	87
<b>Figura II.16</b>	Cuantificación del RNAg y RNAag en células silenciadas.	88



---

<b>Figura II.17</b>	Efectos de los siRNA sobre la síntesis de VP90.	89
<b>Figura II.18</b>	Anotaciones GO (gene Ontology) para la categoría compartimento celular de las proteínas identificadas de las fracciones FFZE.	90
<b>Figura II.19</b>	Número de proteínas únicas anotadas en las categorías GO de compartimento celular.	93

---

### 3. LISTA DE TABLAS

#### 3.1. Lista de tablas de la introducción

<b>Tabla I.1</b>	Patologías en diferentes especies de animales asociadas a infección por astrovirus	18
<b>Tabla I.2</b>	Tipos de vesículas inducidas en las células por virus de (+)RNA	34
<b>Tabla I.3</b>	Factores celulares y su función en la replicación de virus (+)RNA	36

#### 3.2. Lista de figuras de los resultados

<b>Tabla II.1</b>	Lista de proteínas encontradas en la fracción 48-49 de las células infectadas	81
<b>Tabla II.2</b>	Proteínas seleccionadas de la fracción 48-49 de las células infectadas	82
<b>Tabla II.3</b>	Total de proteínas seleccionadas para evaluar su posible función en la replicación de astrovirus	82
<b>Tabla II.4</b>	Marcadores de organelos encontrados en las proteínas de las tres poblaciones de membranas en células infectadas con astrovirus Yuc8	91

---

#### 4. RESUMEN

Los astrovirus son virus pequeños, no envueltos, con un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva [RNA(+)]. Se reconocen como una causa importante de gastroenteritis en niños alrededor del mundo. La replicación del genoma de los virus de RNA(+) y el ensamble de las partículas virales ocurre en asociación con membranas intracelulares con la participación de proteínas celulares. Para profundizar en el estudio de la replicación de la cepa de astrovirus Yuc8, perteneciente al serotipo 8, se separaron las membranas de células Caco-2 infectadas con el virus por medio de gradientes de densidad en iodixanol y la electroforesis zonal de flujo libre, una técnica que permite la separación de membranas con base a la carga neta de las proteínas que se encuentran asociadas a ella. Con esta técnica las membranas celulares se separaron en tres poblaciones bien definidas. Las proteínas estructurales y no estructurales del virus, así como el RNA genómico (RNAg) y antigenómico (RNAag) viral y las partículas infecciosas, se encontraron exclusivamente en una de estas tres poblaciones. Las proteínas celulares asociadas a esta misma población de membranas, aisladas a partir de células infectadas con Yuc8, así como no infectadas, se identificaron por medio de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. En ambas condiciones (células infectadas y no infectadas) se detectó la presencia de proteínas que usualmente se asocian a membranas derivadas de múltiples organelos. El análisis de las anotaciones GO (Gene Ontology) y de las redes de interacción proteína-proteína mostró la presencia, en las células infectadas, de grupos de proteínas altamente enriquecidos en procesos biológicos y funciones moleculares específicos, tales como: gluconeogénesis, oxidación de ácidos grasos, proceso biosintético de ácidos grasos de cadena larga y el ciclo de ácidos tricarboxílicos. Con base en esta información, se silenció por RNA de interferencia la expresión de once genes que codifican proteínas involucradas en los procesos identificados y que habían sido detectadas por LC/MS-MS. Se encontró que siRNAs dirigidos contra genes involucrados en la síntesis de colesterol (*DHCR7*, *CYP51A1*), síntesis de ácidos grasos (*FASN*), metabolismo de fosfatidil inositol (*PI4KIII-B*) e inositol fosfato (*ITPR*) y de actividad RNA helicasa (*DDX23*) causaron una disminución estadísticamente

---

significativa en la síntesis de RNAg y RNAg viral, la síntesis de la proteína estructural del virus VP90, y la producción de partículas infecciosas de astrovirus Yuc8. En este trabajo se propone que estas proteínas celulares pueden tener una función esencial en la replicación de astrovirus Yuc8 en las células Caco-2 y los resultados sugieren que la replicación de astrovirus y el ensamble de las partículas virales se lleva a cabo en asociación con membranas modificadas potencialmente derivadas de múltiples organelos.

---

## 5. ABSTRACT

Astrovirus are small, non-enveloped viruses with a positive strand RNA genome [RNA(+)]. Astroviruses are recognized as an important cause of childhood gastroenteritis around the world. The RNA(+) viruses replicate their genomes and assemble the viral particles in association with intracellular membranes and cellular proteins participation. In order to gain further understanding into the replication of the human astroviruses strain Yuc8 (serotype 8), the membranes were separated from Caco-2 cells infected by using density gradients in iodixanol and Free Flow Zonal Electrophoresis (FFZE), a versatile technique that allows for the separation of membranes, based on net surface charge during laminar flow through a thin aqueous layer. Three populations of membranes were separated by this technique. Structural and nonstructural viral proteins, genomic (RNA<sub>g</sub>)- and antigenomic (RNA<sub>ag</sub>)- viral RNA, and infectious virus particles, were found to be associated exclusively with one of three population of membranes separated by FFZE. The cellular proteins associated with this population of membranes in Yuc8 infected and mock-infected cells were identified by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The presence of proteins, usually associated to membranes derived from multiple organelles was detected in both conditions (infected and mock-infected cells). Gene ontology and protein-protein interaction network analysis showed that groups of proteins with roles in specific biological processes and molecular functions were highly enriched in infected cells: gluconeogenesis, fatty acid beta oxidation, long chain fatty acyl-CoA biosynthetic process and tricarboxilic acid cycle. Based on this information the expression of eleven genes, involved in the identified processes and previously identified by LC-MS/MS, were down regulated by RNA interference. A significant statistical decrease in amounts of astrovirus Yuc8 genomic and antigenomic RNA, structural protein VP90 synthesis, as well as a decrease in virus yield was found with siRNA against genes involved in cholesterol (*DHCR7*, *CYP51A1*) and fatty acid (*FASN*) synthesis, phosphatidylinositol (*PI4KIII-β*) and inositol-phosphate (*ITPR3*) metabolism, and RNA helicase activity (*DDX23*).

---

In this work it is proposed that those proteins could have an essential role in replication of astrovirus Yuc8 in Caco-2 cells and these results strongly suggest that astrovirus RNA replication and particle assembly take place in association with modified membranes potentially derived from multiple cell organelles.

---

## 6. INTRODUCCIÓN

### 6.1. ASTROVIRUS

#### 6.1.1 Familia *Astroviridae*

Los astrovirus son virus pequeños, no envueltos con morfología icosaédrica y genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. El término astrovirus fue adoptado por Madeley y Cosgrove en 1975 para describir los virus observados por microscopía electrónica en las heces de un niño hospitalizado con diarrea; lo virus que observaron eran pequeños redondos con una distintiva apariencia de estrella de seis puntas (astron, estrella en griego) (Méndez *et al.*, 2013).

La familia *Astroviridae* comprende dos géneros, avastrovirus y mamastrovirus, los cuales infectan aves y mamíferos respectivamente. Los astrovirus se han asociado a gastroenteritis en mamíferos, mientras que en aves se ha asociado con patologías más severas, tales como, hepatitis en patos (Cough *et al.*, 1984), síndrome de enteritis y mortalidad aviar (PEMS por sus siglas en inglés) (Koci *et al.*, 2000), y nefritis intersticial en pollos (Imada *et al.*, 2000).

Hasta el momento la lista de especies de animales susceptibles a la infección por astrovirus ha crecido e incluye animales domésticos, sinantrópicos y salvajes (De Benedictis *et al.*, 2011), así como aves y mamíferos en ambientes terrestres y acuáticos. En la última década ha habido un aumento en la identificación de nuevos astrovirus en animales debido a mejoramiento de técnicas moleculares, y en particular al uso de la secuenciación masiva de DNA, que ha posibilitado la identificación del virus. En la tabla I.1 se resume la cronología de astrovirus descubiertos, así como la patología asociada.

**Tabla I.1.** Patologías en diferentes especies de animales asociadas a infección por astrovirus.

Especie	Fecha de detección	Enfermedad asociada
Human ( <i>Homo sapiens</i> )	1975 Madeley and Cosgrove	Gastroenteritis en niños
Ovine ( <i>Ovis aries</i> )	1977 Snodgrass and Gray	Diarrea en borregos
Bovine ( <i>Bos taurus</i> )	1978 Woode and Bridger	Diarrea en crías
Chicken ( <i>Gallus gallus</i> )	1979 Yamaguchi et al.	Nefritis intersticial en crías
Pig ( <i>Sus scrofa</i> )	1980 Bridger	Diarrea en crías
Dog ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	1980 Williams	Diarrea en crías
Cat ( <i>Felis catus</i> )	1981 Hoshino et al.	Pirexia y diarrea
Red deer ( <i>Cervus elaphus</i> )	1981 Tzipori et al.	Diarrea
Duck ( <i>Anas platyrhynchos domestica</i> )	1984 Gough et al.	Hepatitis aguda y mortalidad en patitos
Mouse ( <i>Mus musculus</i> )	1985 Kjeldsberg and Hem	Diarrea
Turkey ( <i>Meleagris meleagris</i> )	1980 McNulty et al.	síndrome de enteritis aviar y mortalidad
Mink ( <i>Neovison vison</i> )	2002 Englund et al.	Diarrea en pre-destete
Guinea fowl ( <i>Numida meleagris</i> )	2005 Cattoli et al.	Enteritis
Insectivorous bat (**)	2008 Chu et al.	-
Cheetah ( <i>Acinonyx jubatus</i> )	2009 Atkins et al.	Letargia, anorexia, diarrea
California sea lion ( <i>Zalophus californianus</i> )	2010 Rivera et al.	Diarrea
Steller sea lion ( <i>Eumelopias jubatus</i> )	2010 Rivera et al.	No hay signos de diarrea en crías
Bottlenose dolphin ( <i>Tursiops truncatus</i> )	2010 Rivera et al.	Clinicamente sanos
Brown rat ( <i>Rattus norvegicus</i> )	2010 Chu et al.	-
Roe deer ( <i>Capreolus capreolus</i> )	2010 Smits et al.	Diarrea

Tomada y modificada de De Benedictis *et al.*, 2011.

### 6.1.2. Astrovirus humanos

Los astrovirus que infectan humanos (HAstV) pueden causar en general gastroenteritis en niños menores de dos años, adultos mayores e individuos inmunocomprometidos (Méndez *et al.*, 2013; De Benedictis *et al.*, 2011). Tras la infección los síntomas clínicos incluyen presencia de diarrea, vómito, dolor de cabeza, dolor abdominal y anorexia (Méndez *et al.*, 2013), sin embargo hay evidencia que muestra que la infección puede ser asintomática tanto en niños como en adultos (Méndez-Toss *et al.*, 2004).

Hasta el 2008, se conocían 8 genotipos de astrovirus (HAstV1-8) los cuales ahora se clasifican como astrovirus humanos "clásicos" (De Benedictis *et al.*, 2011). Estos fueron identificados usando oligonucleótidos dirigidos a una secuencia conservada del ORF1b. Por medio del mejoramiento de las técnicas de secuenciación masiva de DNA se han identificado otros astrovirus humanos en muestras de heces como el astrovirus MLB1 identificado en un niño de Melbourne Australia (Finkbeiner (a) *et al.*, 2009).



---

Adicionalmente se ha caracterizado el astrovirus VA1 a partir de muestras tomadas en un brote de diarrea en Virginia, EUA (Finkbeiner (b) *et al.*, 2009) y se aislaron de adultos tres nuevas especies de astrovirus las cuales están relacionadas filogenéticamente con astrovirus de ovino y de visón (mink en inglés), de ahí su nombre HMO (human-ovine-mink) (Kapoor *et al.*, 2009). Hasta el momento la clasificación de astrovirus muestra que hay tres clados de astrovirus co-circulando en humanos: los astrovirus clásicos, los similares a MLB1 y los similares a VA1 Figura I.1 (Walter *et al.*, 2001; Wolfaardt *et al.*, 2011).

Adicionalmente a las patologías causadas por astrovirus descritas hasta el momento, hay nuevos reportes acerca de la detección de astrovirus en tejido neuronal y se les ha atribuido una posible asociación con encefalitis (Quan *et al.*, 2010; Naccache *et al.*, 2015). En humanos se ha reportado el caso de un adulto con leucemia leucocítica crónica; que debido a la presencia de degeneración neurológica, se realizó biopsia de tejido cerebral y por medio de secuenciación masiva de DNA e hibridización *in situ* se encontró infección invasiva por astrovirus (Naccache *et al.*, 2015). La secuenciación y el análisis filogenético ubicó al astrovirus en el clado VA/HMO que incluye los astrovirus VA-1 y HMO-C y que se encuentra filogenéticamente lejos de los HAsTV clásicos (Figura I.1). El astrovirus del paciente fue llamado provisionalmente (HAsTV-VA1/HMO-C-UK1) (Naccache *et al.*, 2015). En otro caso clínico, por pirosecuenciación no sesgada, se detectó astrovirus como agente causante de encefalitis en un niño de 15 años con agammaglobulinemia (Quan *et al.*, 2010) el cual fue denominado Puget Sound (HAsTV-PS). El análisis de la secuencia de la cápside ubicó a este virus en un clado junto con los astrovirus ovino, visón y de murciélago (Quan *et al.*, 2010). Y en otro caso clínico, a partir de biopsia cerebral se identificó por secuenciación el astrovirus HAsTV-VA1/HMO-C-UK1, adicionalmente, se encontró el virus en heces y suero (Brown *et al.*, 2015). Estos hallazgos sugieren que los astrovirus VA1/HMO-C, a diferencia de HAsTV 1-8, pueden ser neuropáticos particularmente en pacientes inmunocomprometidos y se ha propuesto que podrían ser considerados como diagnóstico diferencial de encefalopatía (Brown *et al.*, 2015).

De manera similar a lo anterior, se han detectado astrovirus en tejido cerebral de visones que presentaban síntomas neurológicos (shaking mink syndrome) (Blomström *et al.*, 2010), y estudios de metagenómica de tejido cerebral de bovinos jóvenes identificaron un astrovirus relacionado filogenéticamente con astrovirus ovino, el cuál se denominó BoAstV-NeuroS1 y se describió como una causa potencial de enfermedad neurológica en bovinos (Li *et al.*, 2013).

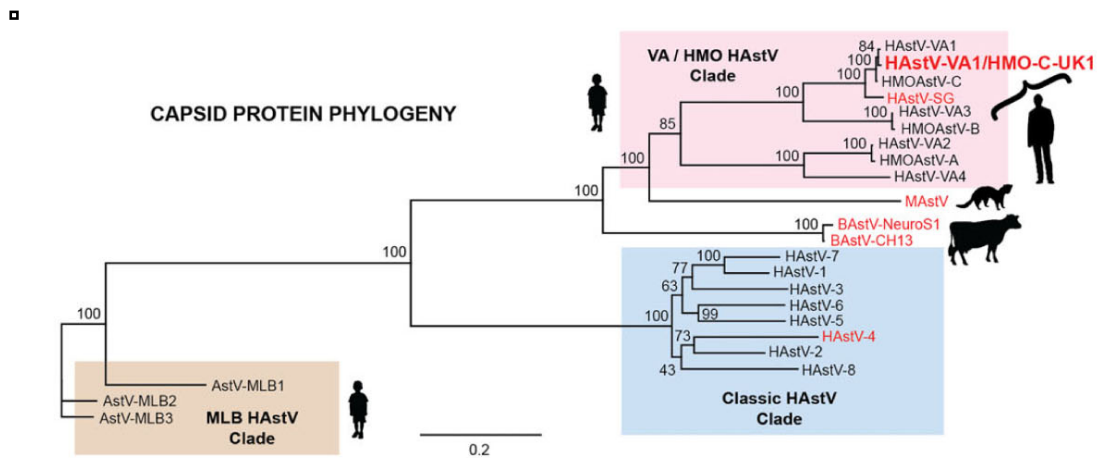


Figura I.1. Árbol filogenético de astrovirus humanos. Tomado de Naccache *et al.*, 2015.

## 6.2. COMPONENTES ESTRUCTURALES DE ASTROVIRUS Y SUS FUNCIONES.

### 6.2.1. Genoma

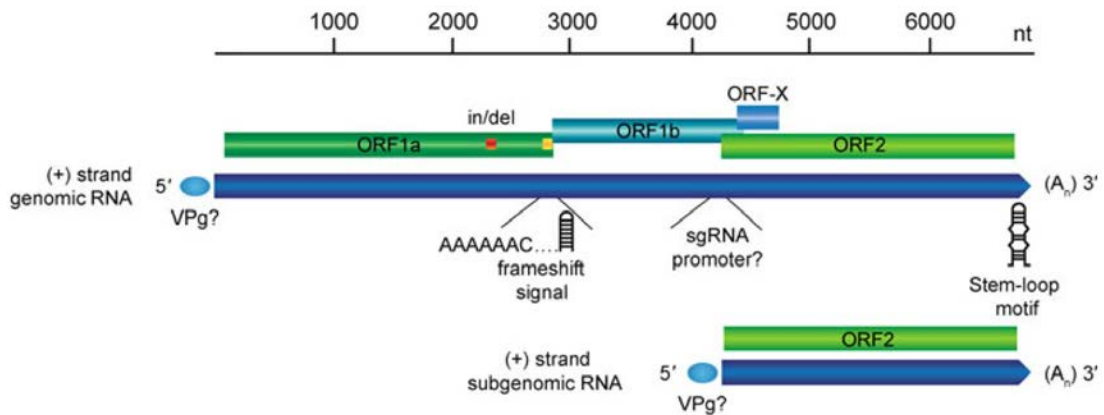
El genoma de astrovirus es de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, tiene entre 6.8-7.2 kilo bases (kb). En las células infectadas se pueden encontrar tres tipos de RNA, el RNA genómico (RNAg), el cual sirve de molde para sintetizar el RNA antigenómico (RNAag), a partir del cual se generan más copias del RNAg para ser encapsidados en las nuevas partículas virales, y se transcribe el RNA subgenómico (RNAsg) a partir del cual se sintetiza la poliproteína estructural. El RNA tiene una cola de poli-A y en el extremo 5' se encuentra

unida de manera covalente la proteína VPg la cual es necesaria para llevar a cabo la replicación del genoma (Fuentes(a) *et al.*, 2012). En el extremo 3' se encuentra una secuencia altamente conservada denominada "stem loop II" aunque aún no se ha asignado una función para esta estructura (Jonassen *et al.*, 1998).

El RNA viral contiene tres marcos abiertos de lectura (ORF), hacia el extremo 5' se encuentran los ORF1a y ORF1b que codifican para las poliproteínas no estructurales (proteasa, RNA polimerasa y VPg). El ORF1a se sobrelapa con el ORF1b y en ese sitio ocurre un cambio de fase ("frame shift", en inglés) caracterizado por una secuencia heptamérica conservada y una estructura de "hairpin" (Jiang *et al.*, 1993; Marczinke *et al.*, 1994). El tercer ORF, ubicado hacia el extremo 3', ORF2, es común para el RNAg y RNAsg y codifica para la poliproteína estructural (Monroe *et al.*, 1991; Willcoks *et al.*, 1993).

También se ha predicho la existencia de un ORF pequeño denominado ORFx localizado dentro de la secuencia del ORF2, sin embargo no hay evidencia experimental del producto que codifica (Firth *et al.*, 2010).

▫



**Figura I.2. Estructura del genoma de astrovirus.** Tomado de: Méndez (b) *et al.*, 2013.

---

### 6.2.2. Proteínas no estructurales

Al igual que los demás virus de (+)RNA, astrovirus traduce sus proteínas como poliproteínas las cuales son procesadas para dar origen a las proteínas virales individuales. A partir del ORF1a se sintetiza la proteína nsp1a y de los ORF 1a y 1b se sintetiza la poliproteínas nsp1ab (Figura I.3). La poliproteína nsp1a contiene dos dominios coiled-coil, cinco dominios transmembranales, el dominio que codifica para la VPg y el dominio de proteasa (Jonassen *et al.*, 2003). Hacia la región C-terminal también se encuentra un dominio de muerte ("dead domain"), una señal de localización nuclear y una región donde se han encontrado inserciones y deleciones (Méndez *et al.*, 2013). La región C-terminal incluye un dominio híper variable (HVR) el cual se ha propuesto es importante para la replicación, ya que cambios en esta región se ha relacionado con diferencias en la replicación viral y adaptación a cultivo en células (Willcoks *et al.*, 1994; Guix *et al.*, 2005). Se ha descrito que proteínas recombinantes correspondientes a esta región son fosfoproteínas que pueden interactuar con la polimerasa viral *in vitro* (Fuentes (b) *et al.*, 2011).

Una vez que la poliproteína nsp1a ha sido sintetizada, es procesada por la misma proteasa viral y se ha sugerido que también por alguna proteasa celular, ya que el procesamiento *in vitro* de la proteína no es completo, lo que sugiere que factores celulares son requeridos para el procesamiento final (Méndez *et al.*, 2013). Se han identificado varios productos de procesamiento para las proteínas nsp1a y nsp1ab (Geigenmuller *et al.*, 2002; Willcocks *et al.*, 1999) dentro de los cuales se ha comprobado la actividad biológica de la proteasa viral de 27 kDa y de la RNA polimerasa de 57 kDa (Figura I.3). Después de la región codificante por la proteasa viral, se encuentra la región codificante para la VPg, la cual es una proteína de 13 a 15 kDa (Fuentes *et al.*, 2012).

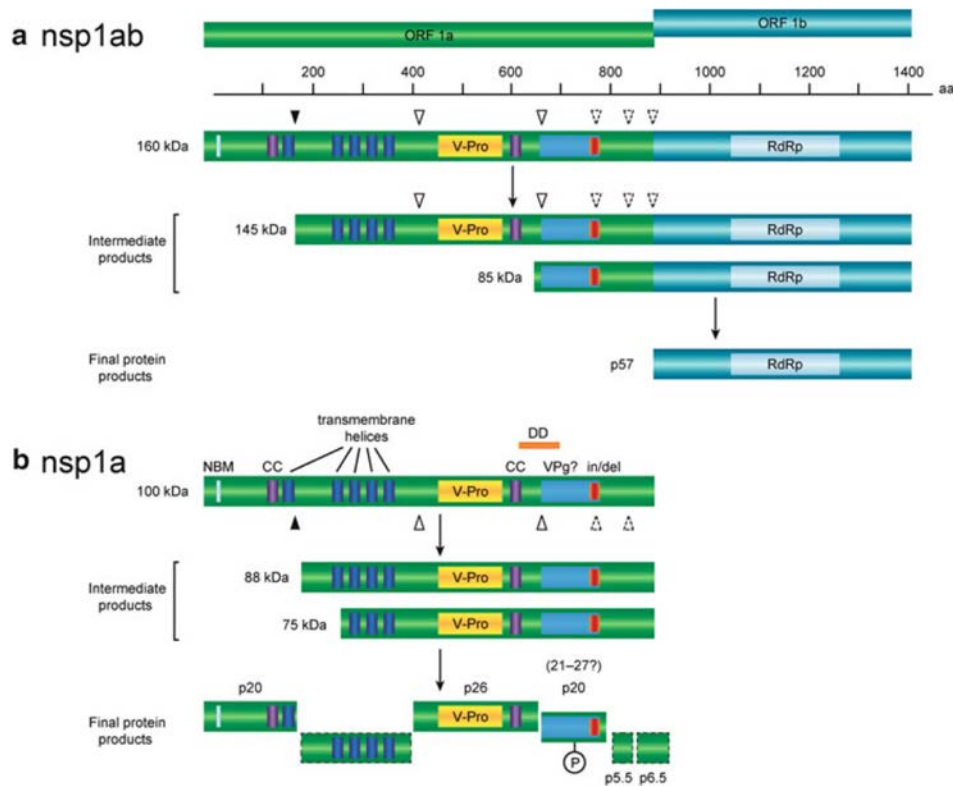
### 6.2.3. Proteínas estructurales

Las proteínas estructurales son traducidas a partir del RNAsg (Figura I.4) Monroe *et al.*, 1991; Willcoks *et al.*, 1993). El producto principal es una proteína de 87-90 kDa, llamada VP90, la cual es ensamblada en las partículas virales. Esta proteína es procesada a VP70

por caspasas en el extremo C-terminal, y esta forma procesada es la que se encuentra en los viriones que salen de las células infectadas (Méndez, *et al.*, 2004; Banos-Lara *et al.*, 2011). Para ser infectivos, estos viriones que contienen VP70 deben ser procesados por tripsina (presente en el tracto digestivo de los animales infectados) (Bass *et al.*, 2000; Mendez *et al.*, 2002) lo que da lugar a los viriones maduros que contienen las proteínas VP34, VP27 Y VP25 (Figura I.4) (Méndez *et al.*, 2002, Dryden *et al.*, 2012).

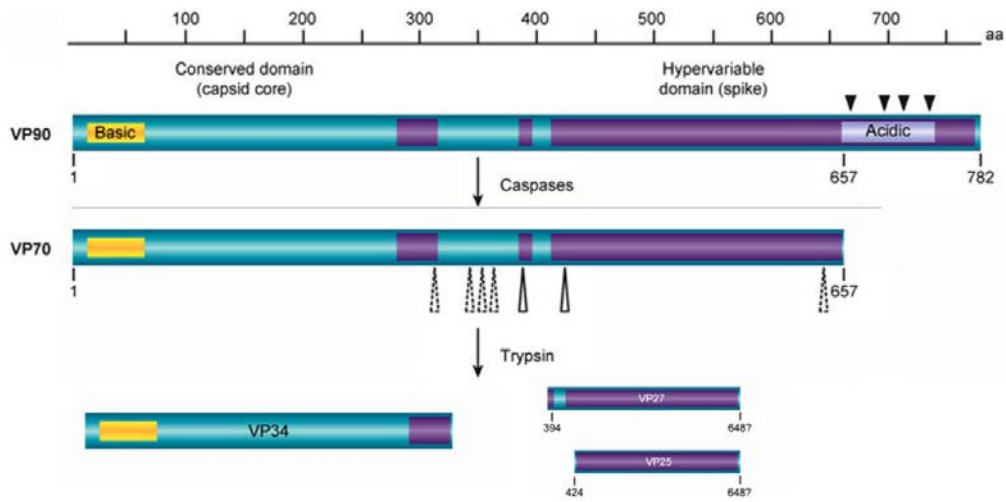
La proteína VP90 se caracteriza por tener un dominio rico en aminoácidos básicos y altamente conservados hacia el extremo N-terminal y se ha predicho que esta región podría interactuar con el RNA para formar la nucleocápside (Krishna *et al.*, 2005). Por otro lado, el extremo C-terminal contiene una secuencia muy variable exceptuando a los dominios ricos en aminoácidos ácidos, donde se encuentran los sitios de corte por caspasas (Figura I.4, Dong *et al.*, 2011; Méndez *et al.*, 2004).

□



**Figura I.3. Proteínas no estructurales de astrovirus.** Tomado de: Méndez (b) *et al.*, 2013.

□



**Figura I.4. Proteína estructural de astrovirus.** Tomado de: Méndez (b) *et al.*, 2013.

#### 6.2.4. Ciclo de replicación de astrovirus

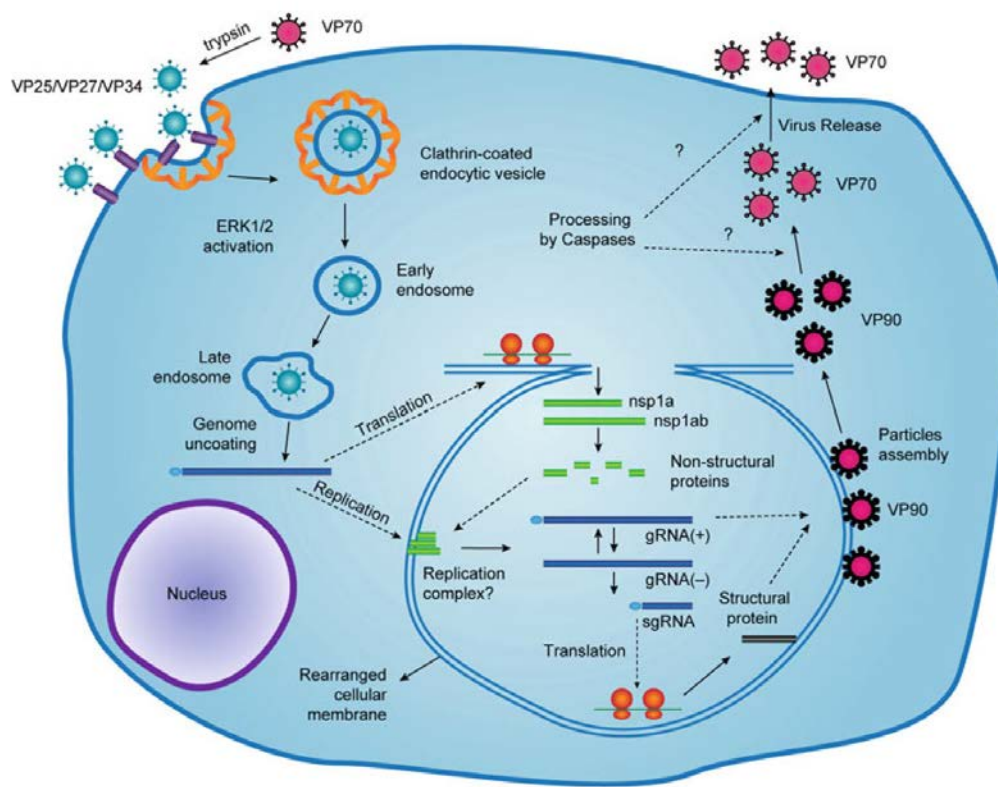
El ciclo de replicación de astrovirus (Figura I.5) comienza con el procesamiento proteolítico de las partículas virales en el intestino de los animales infectados; las partículas virales formadas por la proteína VP70 son procesadas por tripsina para dar las proteínas maduras de la cápside, VP34, VP27 y VP25 en el astrovirus de humano Yuc8, que es el virus que utilizamos como modelo de estudio en nuestro laboratorio. Este procesamiento produce cambios estructurales en el virión (Bass *et al.*, 2000).

Las partículas virales, una vez procesadas, se unen al receptor de membrana (aún no identificado). En este sentido se ha demostrado que diferentes serotipos de virus presentan diferencias en su tropismo para infectar células en cultivo, lo que sugiere que astrovirus puede utilizar más de una molécula celular receptora (Méndez (b) *et al.*, 2013)

Adicionalmente el reporte reciente sobre la estructura de la cápside de astrovirus de pavo (TAstV-2) mostró diferencias morfológicas respecto a la estructura de la cepa de HAstV-8 Yuc8 (DuBois *et al.*, 2013).

La caracterización de la entrada del HAstV-8 en células Caco-2 (Méndez *et al.*, 2014) mostró que el tiempo de unión del virus a la célula es de 9.24 minutos y que la internalización del virus es mediada por endocitosis dependiente de clatrina. Experimentos dirigidos a determinar la ruta de entrada del virus a la célula han sugerido que HAstV-8 es transportado hasta los endosomas tardíos antes de ingresar al citosol (Méndez *et al.*, 2014).

□



**Figura I.5. Ciclo de replicación de astrovirus.** Tomado de: Méndez (b) *et al.*, 2013.

Después de la internalización de la partícula viral, el genoma es liberado al citoplasma en un tiempo medio de 130 minutos (para HAstV8 Yuc8 en células Caco-2), el cual se traduce en las poliproteínas no estructurales nsp1a (alrededor de 101kDa) y nsp1ab (alrededor de

---

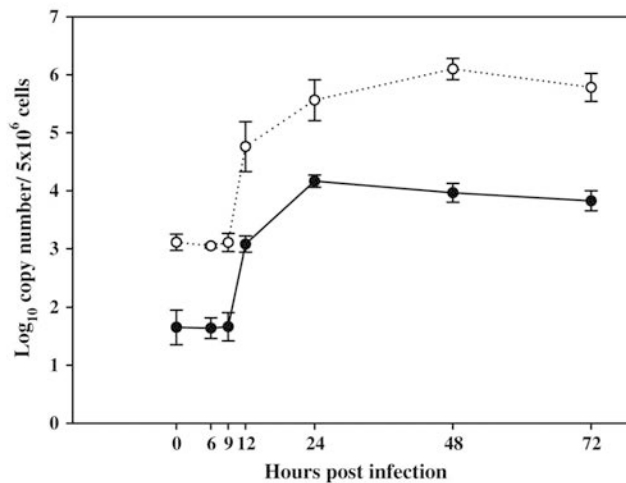
160 kDa) (Méndez *et al.* 2013). La traducción del ORF1a para producir nsp1a se detiene en un codón ámbar, mientras que el ORF 1b se traduce en la proteína nsp1ab por un "cambio de fase" ("frame shift", en inglés) que ocurre en la sobre posición del ORF1a y Orf1b (Méndez (b) *et al.* 2013). Las dos poliproteínas son cortadas por la serin-proteasa viral para producir las proteínas no estructurales (Figura I.3) las cuales varían de tamaño dependiendo del astrovirus y las células infectadas (Méndez *et al.*, 2013), entre ellas se encuentran la proteasa viral (27 kDa), la RNA polimerasa (57kDa) y la VPg (13 a 15 kDa) (Fuentes *et al.*, 2012).

Del ORF2 se traduce la poliproteína estructural (87-90 kDa) (Figural.4) sintetizada a partir del RNAsg (Méndez (b) *et al.*, 2013). La proteína VP90 se ensambla en las partículas virales y es procesada en su extremo carboxilo terminal por caspasas celulares produciendo la proteína VP70 (Méndez *et al.*, 2002).

Los detalles de la replicación y transcripción del genoma de astrovirus no se han elucidado, pero se sugiere que puede compartir algunos aspectos con otras familias de virus de (+)RNA. De esta manera se asume que el RNAg se usa como templado para sintetizar el RNAsg, el cual a su vez se emplea como molde para producir los RNAsg y los RNAsg (Méndez *et al.*, 2013).

Se ha detectado el RNAsg en células infectadas con HAstV-8 o virus procedente de aislados clínicos entre 8 y 9 horas post-infección (hpi) (Jang *et al.*, 2010; Méndez *et al.*, 2013). En la figura I.6 se observa que el aumento del RNAsg coincide con el incremento en el RNAsg (Jang *et al.*, 2010).





**Figura I.6. Cinética de la síntesis de RNA genómico y antigenómico de astrovirus.** A partir de células Caco-2 infectadas con HAdV se extrajo el RNA en los tiempos indicados. Las reacciones de retrotranscripción se realizaron con un primer antisentido para el RNAg o sentido para el RNAAg. Con los cDNAs resultantes se realizó qRT-PCR y el número de copias de las moléculas de cDNA se calculó y graficó. Círculos blancos, RNAg; círculos negros, RNAAg. Tomado de: Jang *et al.*, 2010.

Se ha encontrado que los virus de (+)RNA que se han caracterizado hasta ahora realizan la replicación de su genoma y el ensamblaje de las partículas virales en el citoplasma en asociación con membranas celulares (ver más adelante). En el caso de astrovirus existen datos generados en nuestro laboratorio que sugieren la asociación de la replicación de astrovirus a membranas (ver sección Antecedentes), aunque no se conoce hasta el momento el sitio intracelular donde estos procesos se llevan a cabo. Además de esto, no hay reportes acerca de las proteínas celulares que pudieran tener alguna función en el remodelamiento de membranas, reclutamiento del RNA viral al sitio de replicación o ensamblaje del complejo de replicación (ver más adelante).

En cuanto a la salida de las partículas virales se ha descrito que el procesamiento del precursor de la cápside (VP90) es necesario para la liberación del virus al exterior de la célula (Méndez *et al.*, 2004, Banos-Lara *et al.*, 2010). En células Caco-2 infectadas con

---

HAsTV-8 se ha observado que al utilizar el inhibidor de caspasas Z-VAD-fmk durante la infección, no se detecta VP70 ni dentro de las células ni en el sobrenadante (Méndez *et al.*, 2004), y se observó lo opuesto al utilizar el inductor de apoptosis TRAIL, el cual provocó el aumento del virus encontrado fuera de las células (Méndez *et al.*, 2004). Por medio del uso de inhibidores específicos para caspasas y la inhibición de la expresión de las mismas mediante siRNA, se determinó que las caspasas -3, -8 y -9 reconocen a VP90 y la cortan produciendo VP70 (Banos-Lara *et al.*, 2010).

En células Caco-2, la salida del virus no induce daño en la membrana celular durante infecciones *in vitro* (Banos-Lara *et al.*, 2010), aunque incrementa la permeabilidad de la barrera epitelial que puede correlacionarse con una ruptura de las uniones estrechas en el epitelio intestinal durante las infecciones *in vivo* (Moser *et al.*, 2007) lo que podría incrementar la salida del virus.

A pesar de que se ha encontrado que la infección causa poco daño morfológico en el intestino (Behling-Kelly *et al.*, 2002; Koci *et al.*, 2003), existen reportes de lisis celular causada por astrovirus en una línea celular de riñón porcino (Shimizu *et al.*, 1990). No es claro por qué algunos astrovirus utilizan una vía de salida que cause lisis mientras que otros usan una vía que no lleve a la lisis celular.

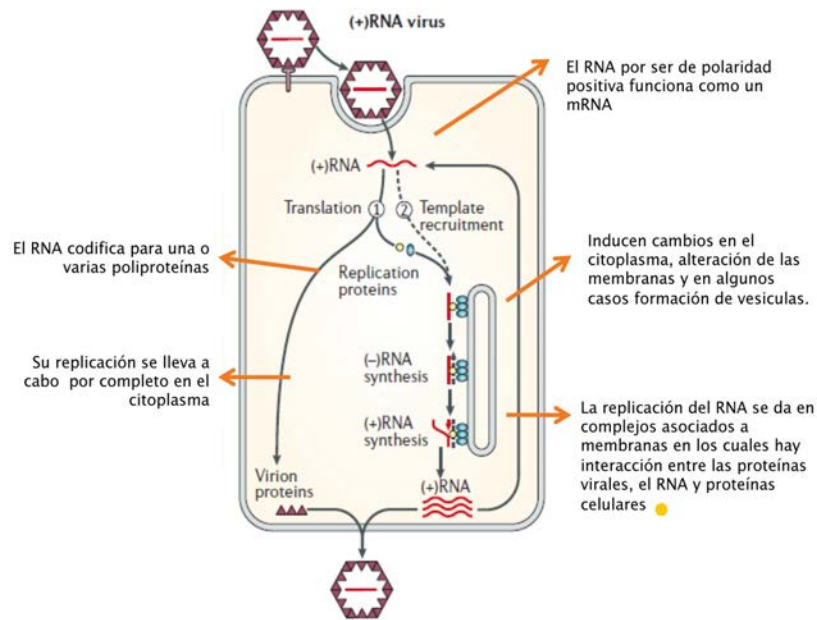
### **6.3. CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS INDUCIDOS POR VIRUS DE (+)RNA EN LAS CÉLULAS**

Los virus se caracterizan por tener genomas pequeños con relación a su hospedero, y no codifican para todas las proteínas necesarias para llevar a cabo el ciclo de replicación, de esta manera los diferentes pasos del ciclo de replicación viral involucran interacciones entre los relativamente pocos componentes virales y muchos más factores celulares (Ahluquist *et al.*, 2003). Así, los virus de (+)RNA toman ventaja de las células utilizando proteínas celulares, remodelando las membranas de los organelos, apropiándose y modulando las proteínas y complejos de ribonucleoproteínas y alterando las vías metabólicas durante la infección (Nagy *et al.*, 2012).

### 6.3.1. Modificación de las Membranas Intracelulares

Los virus de (+)RNA comparten varias características del ciclo de replicación (Figura I.7) y entre ellas se encuentra el inducir cambios en el citoplasma y alterar las membranas de los organelos subcelulares, lo que lleva a la formación de diferentes tipos de estructuras de membrana donde se lleva a cabo la replicación.

□

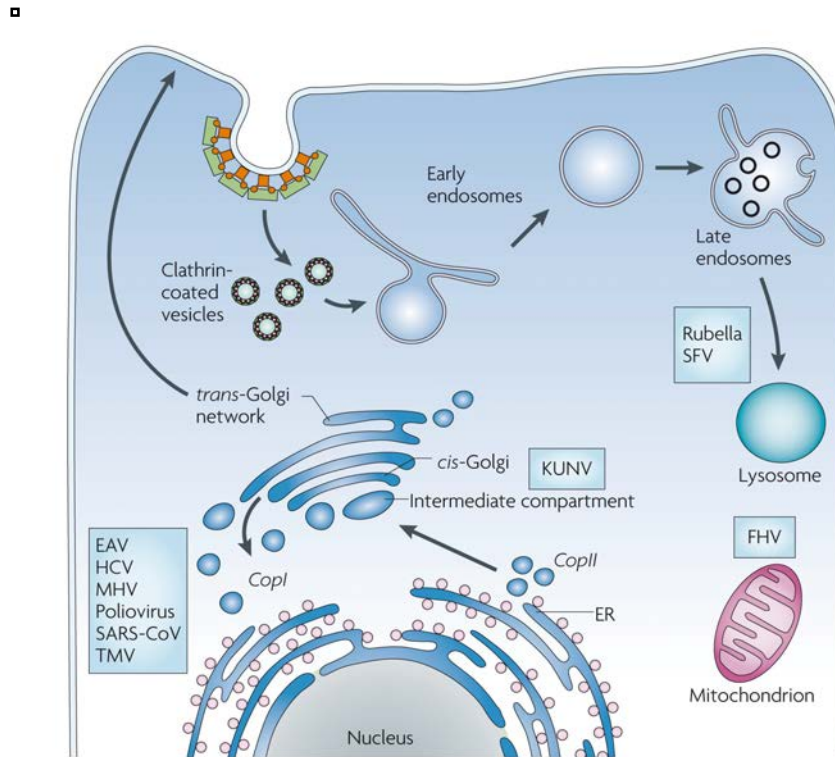


**Figura I.7. Ciclo de replicación de virus (+)RNA.** Tomado y modificado de: Ahlquist 2006.

Se ha descrito para diferentes virus la manera como utilizan las principales vías de tráfico celular secretora y endocítica (Miller *et al.*, 2008). Los virus aprovechan estas dos vías para modificar las membranas de los organelos involucrados (Figura I.8) (Miller *et al.*, 2008) y creando estructuras de membranas con características morfológicas diferentes.

Se ha sugerido que las modificaciones en las membranas intracelulares traen ventajas para el virus, tales como incrementar la concentración de los factores necesarios para la replicación viral, coordinar espacialmente diferentes procesos del ciclo de replicación,

como replicación del RNA y ensamble de las partículas virales y crear un ambiente donde el RNA esté aislado y protegido de la degradación (Paul *et al.*, 2013; Belov *et al.*, 2008). Adicionalmente en estas estructuras se reclutan proteínas celulares que junto a la RNA polimerasa y el genoma viral forman el complejo de replicación (Nagy *et al.*, 2012).



**Figura I.8. Organelos utilizados por diferentes virus (+)RNA para remodelar sus membranas y generar fábricas de replicación.** Tomado de: Miller *et al.*, 2008.

Las modificaciones de las membranas inducidas por los virus de (+)RNA se han descrito como vesículas invaginadas o vesículas tipo esfera y de doble membrana (Figura I.9) (Paul *et al.*, 2013).

### 6.3.1.1. Vesículas invaginadas-Esférulas

La formación de este tipo de vesículas es inducida por alfavirus como Semliki Forest virus (SFV) (Kujala *et al.*, 2001) y Sindbis virus (SINV) (Frolova *et al.*, 2010), así como también por

---

Flock House Virus (FHV) (Kopek *et al.*, 2007), el virus de la rubeola (RUBV) (Fontana *et al.*, 2010), Virus del Dengue (DENV) (Welsch *et al.*, 2009) and el Virus del oeste del Nilo (WNV) (Gillespie *et al.*, 2010).

Los alfavirus inducen la formación de vacuolas citoplasmáticas (CPVs) que contienen pequeñas invaginaciones denominadas esférulas (Figura I.9A) que son internalizadas por los endosomas dando origen a las estructuras CPV. Se ha observado que las esférulas tienen una estructura en forma de "abertura", estructura que se ha encontrado en las modificaciones de membrana generadas por otros virus y la cual se cree funciona como un cuello de botella por el cual entran las moléculas necesarias para la replicación del RNA viral (Miller *et al.*, 2008).

Para FHV se han descrito invaginaciones en la membrana externa de la mitocondria (Miller *et al.*, 2001), las cuales tienen un cuello que conecta el lumen de la esférula con el citoplasma (Kopek *et al.*, 2007) (Figura I.9B).

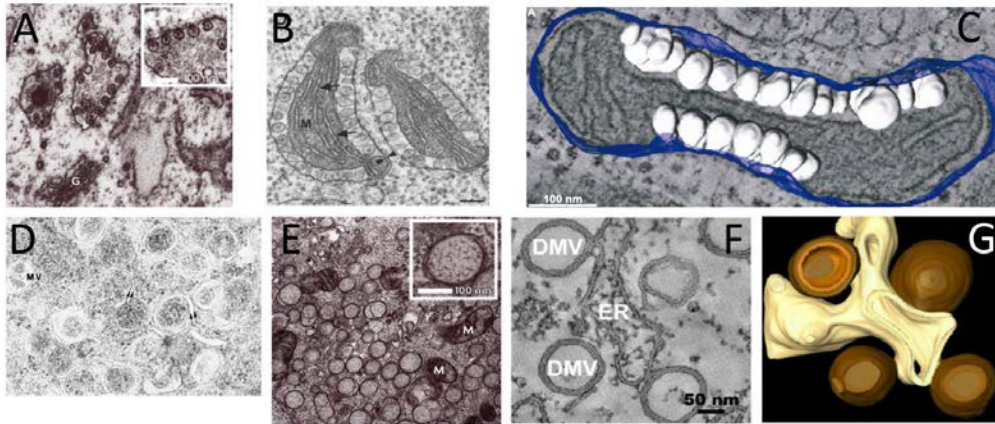
En contraste a este tipo de compartimentos de replicación, los virus de la familia *Flaviviridae* como WNV y DENV utilizan membranas del retículo endoplásmico para generar las fábricas de replicación. DENV induce la formación de membranas convolucionadas (CMs) en las células infectadas las cuales al microscopio electrónico se observan como invaginaciones en el retículo endoplásmico rugoso las cuales se conectan con el citoplasma a través de un cuello (Welsch *et al.*, 2009). De manera similar en células infectadas por WNV se ha observado invaginaciones en el retículo endoplásmico rugoso (Gillespie *et al.*, 2010)

### **6.3.1.2. Estructuras de doble membrana**

Las estructuras de replicación de doble membrana son inducidas por CVB3 (Limpens *et al.*, 2011), PV (Belov *et al.*, 2012), SARS-CoV (Knoops *et al.*, 2008), EAV (Knoops *et al.*, 2012) y HCV (Romero-Brey *et al.*, 2012).

La infección por PV induce la formación de estructuras tubulares detectadas en los tiempos tempranos de infección las cuales se van modificando en estructuras de doble membrana (Figura I.9) (Belov *et al.*, 2012). Las estructuras tempranas provienen del





**Figura I.10. Rearreglos de membrana inducidos por virus (+)RNA. (A)** Vacuolas citopáticas inducidas por infección con Semliki Forest Virus (SV) en células BHK, tomada de Miller *et al.*, 2008. **(B)** Cambios ultra estructurales tempranos en mitocondrias de células de insecto DL-1 infectadas con FHV, tomado de Miller *et al.*, 2001. **(C)** Mapa 3D de una mitocondria modificada por infección con FHV, se muestran esférulas en la membrana de la mitocondria, tomado de Kopek *et al.*, 2007. **(D)** Morfología detallada de membranas inducidas por PV en células HeLa, tomado de Schlegel *et al.*, 1996. **(E)** Cluster de vesículas de doble membrana (DMVs) en células Vero infectadas con el coronavirus SARS-Co (Severe acute respiratory syndrome coronavirus), tomado de Miller *et al.*, 2008. Imágenes representativas de rearrreglos de membrana inducidos por HCV a través de tomogramas **(F)** y vista 3D axial y lateral (90 °rotación) **(G)**, tomado de Romero-Brey *et al.*, 2014.

**Tabla I.2.** Tipos de vesículas inducidas en las células por virus (+)RNA.

□

Vesículas invaginadas - Esférulas	SFV	FHV	RUBV	DENV
Tipo de fábricas de replicación	Membrana plasmática y Vacuolas citopáticas	Esférulas en la mitocondria	Invaginaciones en las vacuolas citopáticas	Invaginaciones en el retículo endoplásmico
Diámetro de las invaginaciones (nm)	50	50	80-500	90
Organelo del que derivan las membranas	Membrana plasmática, endosomas	Mitocondria	Endosomas	Retículo endoplásmico

Vesículas de doble membrana	PV	CVB3	HCV	SARS-Co
Tipo de fábricas de replicación	Vesículas de doble membrana	Vesículas de doble membrana	Vesículas de doble membrana	Vesículas de doble membrana
Diámetro de las invaginaciones (nm)	30	30	150	150
Organelo del que derivan las membranas	Golgi, Retículo endoplásmico	Golgi, Retículo endoplásmico	Retículo endoplásmico	Retículo endoplásmico

### 6.3.2. Factores celulares usados por los virus (+)RNA

Los virus de (+)RNA utilizan varias proteínas celulares en diferentes pasos de su ciclo de replicación. Dado los avances en técnicas que permiten identificar las proteínas celulares utilizadas por los virus, en los últimos años se ha incrementado el número de publicaciones al respecto. Estas publicaciones incluyen el uso de tamizaje del todo el genoma (Jiang *et al.*, 2006; Panavas *et al.*, 2005), tamizaje por RNAi (Cherry *et al.*, 2005; Krishnan *et al.*, 2008; Sessions *et al.*, 2009), identificación de proteínas por proteómica y



---

ensayos de dos híbridos en levadura (de Chassey *et al.*, 2008).

Entre las funciones que cumplen las proteínas celulares en la replicación de virus se encuentran: reclutamiento de RNA y síntesis de RNA, reclutamiento de proteínas virales y celulares a las membranas y ensamble del complejo de replicación. En la tabla I.3 se resume las proteínas celulares para las que se ha reportado funciones en el ciclo de replicación de virus de (+)RNA.

Los factores celulares tienen muchos y diversos tipos de funciones en todos los pasos del ciclo de replicación viral. Por ejemplo en la entrada, la internalización de Coxsackievirus A9 (CAV9) es dependiente de Arf6 (Heikkilä *et al.*, 2010). En la replicación se ha reportado que Poliovirus (PV) requiere las proteínas ARF1 (Belov *et al.*, 2008) y PI4KIII $\beta$  (Sasaki *et al.*, 2012, Hsu *et al.*, 2010, Berger *et al.*, 2009), el virus de Hepatitis C (HCV) requiere PI4KIII $\alpha$  (Delang *et al.*, 2012) y TMBV requiere del factor eEF1A (Li *et al.*, 2009), Erg25 y SMO1 (Sharma *et al.*, 2010). En la traducción, las proteínas eIF3 y DDX6 facilitan la traducción para YFV (Morais *et al.*, 2013) y HCV (Huys *et al.*, 2013), respectivamente. Finalmente, para el ensamble de las partículas virales, el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) requiere de DDX3 (Soto-Rifo *et al.*, 2013) e ITPR3 (Ehrlich *et al.*, 2010) para la salida de las partículas formadas por la proteína viral Gag.

**Tabla I.3.** Factores celulares y su función en la replicación de virus (+)RNA.

Función en el ciclo de replicación viral	Virus	Factor celular
Reclutamiento de RNA y síntesis de RNA	TBSV, WNV	eEF1 $\alpha$
	PV	PCBP2
	PV	PABP
	HCV, Coronavirus	PTB
	BMV, HCV	LSM1
	PV, HCV, Coronavirus	hnRNPs
	WNV	TIA1
	WNV	TIAR
	TBSV	GAPDH
Reclutamiento de proteínas a membranas	ToMV	TOM1 y TOM3
	HCV	VAPA
	HCV	FBXL2
	TBSV	PEX19
	PV	PI4KIII $\beta$
Ensamble o activación del complejo de replicación	TBSV, FHV	HSP70
	FHV, HCV	HSP90
	FHV, BMV, Flavivirus	HSP40
	HCV	CYPA
	HCV	CYPB
	HCV	FKBP8
	PV	ARF1, GBF1
	Coronavirus	LC3-1
	DENV	FASN
	BMV	Ole1
	TBSV	Erg25, SMO1, SMO2

---

## **6.4. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A MEMBRANAS MEDIANTE GRADIENTES EN IODIXANOL**

Si se quieren obtener las membranas y proteínas asociadas a ellas, es necesario aislar las membranas, lo que implica primero la separación de los componentes, ya sean las células de los tejidos, los organelos de las células, o bien las membranas mismas obtenidas de diferentes partes de las células o sus organelos.

Con el fin de romper las células se utilizan técnicas muy variadas que se pueden agrupar en métodos mecánicos y no mecánicos (Tabla I.4). Los métodos mecánicos implican someter a las células a una deformación en fase sólida o líquida, mientras que los métodos no mecánicos, utilizan reactivos que pueden ser químicos o enzimáticos, cuyo objetivo es romper o lisar la célula.

### **6.4.1. Iodixanol (OPTIPREP)**

El iodixanol fue desarrollado inicialmente como un medio de contraste para rayos X, es un metabolito inerte no iónico y no es tóxico para las células (Axis-Shield (a) 2015).

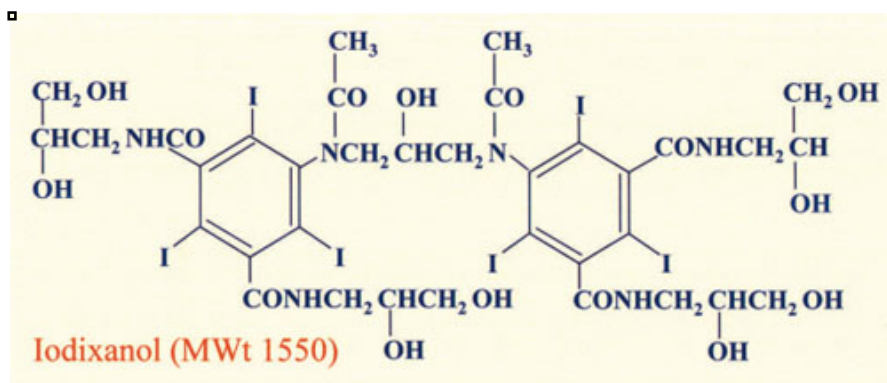
El iodixanol es usado para generar gradientes de densidad, pertenece a las moléculas denominadas iodatos, los cuales han sido usados como medio para generar gradientes. La estructura química de los iodatos está basada en el ácido tri-iodobenzoico, en el que los grupos hidrófilos están unidos para aumentar la solubilidad de estos compuestos en agua (Figura I.11) (<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Centrifugacion.pdf>). En comparación con otros medios para generar gradientes como la sacarosa y el cloruro de cesio (CsCl), los compuestos iodatos tienen grandes ventajas, por ejemplo, su preparación es más sencilla, no es tóxico para las células, a todas las densidades los gradientes de iodato presentan menor viscosidad y osmolaridad que los de sacarosa, las soluciones iso-osmóticas pueden hacerse a diferentes densidades y pueden utilizarse en gradientes continuos, discontinuos o de flotación (<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Centrifugacion.pdf>). Adicionalmente no es necesario remover el iodixanol antes de procedimientos como HPLC o electroforesis en gel (Axis Shield (c) 2009) aunque su estructura absorbe luz en el rango ultravioleta, por lo

---

tanto es necesario retirarlo si se va a determinar cantidad de proteína o ácidos nucleicos en ese rango de longitudes de onda (Axis Shield (c) 2009).

Los gradientes de iodatos pueden ser preformados y la muestra se carga en la parte superior del gradiente. Este método es preferible para la preparación de gradientes isopícnicos y para la separación de partículas grandes (células, organelos etc.) los cuales necesitan ser centrifugados por corto tiempo (2 horas o menos) (<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Centrifugacion.pdf>).

Alternativamente, para partículas pequeñas es posible realizar gradientes autogenerados durante la centrifugación, en este caso, la muestra es mezclada con la solución del gradiente haciendo posible el uso de un mayor volumen de la muestra (Montero L de Guevara).



**Figura I.11.** Estructura del iodixanol.

Utilizando gradientes de iodixanol se pueden separar membranas tanto plasmática como otras membranas subcelulares. La resolución de separación de membranas es mejorada por periodos largos de centrifugación ya que en estas condiciones se alcanza el equilibrio en la densidad de bandeado (Axis Shield (b)).

#### 6.4.2. Electroforesis Zonal De Flujo Libre (FFZE)

Existen diversas técnicas que permiten la separación de fracciones subcelulares, en específico para la separación de organelos; para la identificación de las proteínas asociadas a organelos, provenientes de las fracciones subcelulares, esta separación es necesaria como paso preliminar para el análisis por espectrometría de masas y entre

---

mejor sea la separación de fracciones subcelulares se obtendrá una mejor identificación de proteínas asociadas a organelos por espectrometría de masas.

La Electroforesis de Flujo Libre (FFE, por sus siglas en ingles **F**ree **F**low **E**lectrophoresis) es un sistema de separación electroforética que no utiliza una matriz sólida, por ejemplo de poliacrilamida (Weber *et al.*, 2004). El sistema ProMetHEUS™ FFE system (FFE Weber GmbH, Planegg, Germany) consiste en una cámara de separación con dos placas paralelas (Figura I.12B) en la cual la muestra (se inyecta por medio de una bomba peristáltica) es transportada dentro de una delgada capa (0.4 mm) de medio acuoso mantenido entre las dos placas. Las placas se encuentran delimitadas y conectadas a los electrodos que generan un campo eléctrico de alto voltaje el cual está ubicado de manera perpendicular al flujo laminar, las partículas cargadas (proteínas, organelos, fragmentos de membranas o células) son desviadas, lo que permite una subsiguiente separación y/o fraccionamiento (Weber *et al.*, 2004) (Figura I.11A).

La electroforesis de flujo libre provee una separación en fase fluida de tres diferentes modos (Weber *et al.*, 2004) (Figura I.13):

- electroforesis zonal: Es la separación de un medio homogéneo con base a su carga neta. Permite la separación de organelos, membranas y células completas.

- isoelectroenfoque (IEF): Es la separación de moléculas por su punto isoeléctrico dentro de un gradiente de pH. Permite la separación de proteínas o péptidos.

- isotacoforesis: Es la separación de acuerdo a sus propiedades de movilidad electroforética. Se aplica en la separación de especies de alto peso molecular o complejos de proteínas.

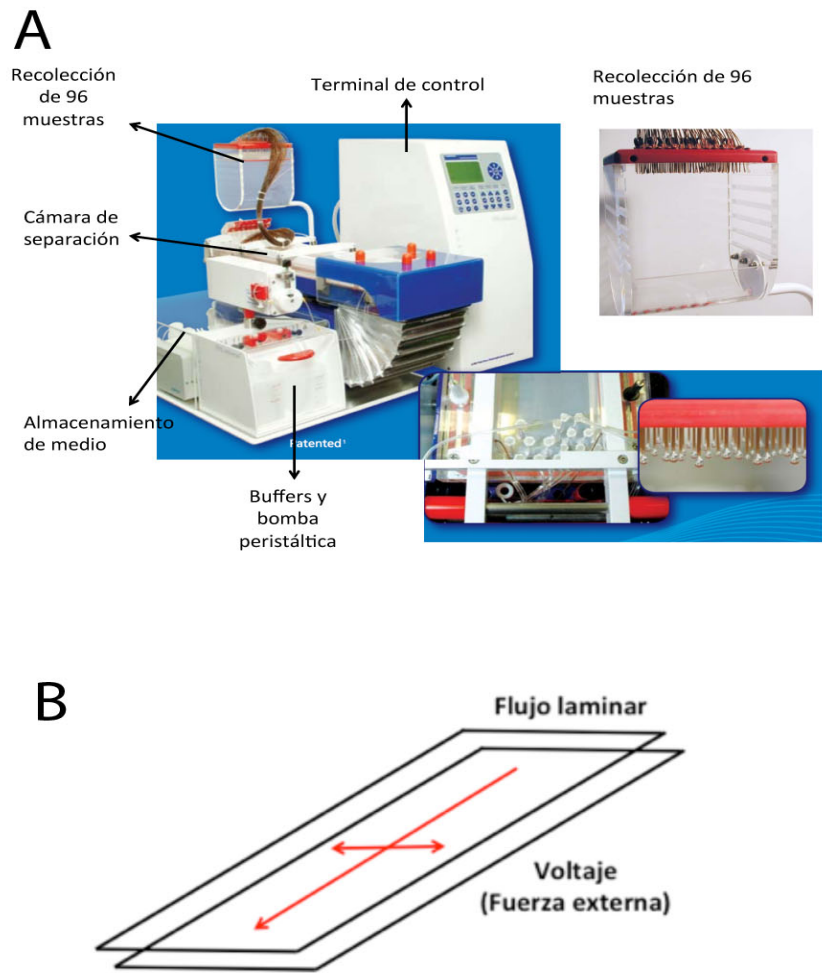
Estos diferentes procedimientos habilitan la separación de organelos, proteínas y otras entidades que posean carga, sobre una base continua, preparativa y rápida. El sistema de FFE permite reducir la complejidad de la muestra purificando células u organelos y

---

también permite enriquecer proteínas de baja abundancia. La tecnología de FFE asegura que las muestras separadas son compatibles con procedimientos subsiguientes, tales como ultracentrifugación, técnicas de separación (electroforesis 1 y 2D) y métodos analíticos como cromatografía líquida y/o espectrometría de masas (Weber *et al.*, 2004).

La electroforesis de flujo libre tiene muchas aplicaciones, en particular, la electroforesis zonal de flujo libre (FFZE) permite la purificación de organelos, por ejemplo Zischka *et al.*, (2003) comparó la obtención y purificación de proteínas de mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando centrifugación diferencial y FFZE. Los autores encontraron una mayor uniformidad de los organelos purificados por FFZE (evaluado por microscopía electrónica) con la consecuente mayor purificación de proteínas de mitocondria comparado con los extractos mitocondriales aislados por ultracentrifugación diferencial (Zischka *et al.*, 2003). También encontraron una disminución en la degradación de proteínas separadas por FFZE y en pasos posteriores a la separación de proteínas. Adicionalmente, con las proteínas purificadas por ambas técnicas, realizaron electroforesis 2D y encontraron 4 veces más proteínas de baja abundancia a partir de las fracciones de proteínas mitocondriales separadas por FFZE con respecto a las purificadas por ultracentrifugación (Zischka *et al.*, 2003). De igual manera, la separación de proteínas por FFZE ha demostrado ser muy útil para la purificación de otros organelos ya que resuelve el problema de contaminación con otras estructuras celulares y mejora el grado de pureza de las fracciones donde se encuentran los organelos (Hoffmann *et al.*, 2001; Barkla *et al.*, 2007).

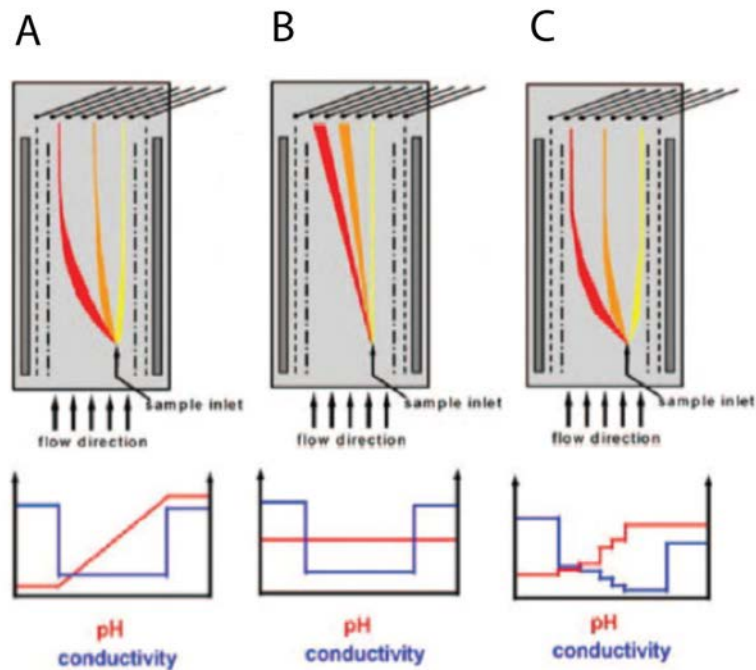
□



**Figura 1.12. Equipo de Electroforesis de Flujo Libre (BD Proteomics).** Principio de la Electroforesis de Flujo Libre (FFE). Modificado de Weber and Wildgruber.

Otro tipo de las aplicaciones para la FFE ha sido o la separación de proteínas de plasma humano, ya que se demostró el enriquecimiento de "spots" en electroforesis 2D donde se separaron 35 fracciones separadas por FFE (Weber *et al.*, 2004)

▪



**Figura I.13. Modos de operación de la electroforesis de flujo libre. (A)** Modo de isoelectroenfoco para la separación de proteínas y péptido en un gradiente de pH. **(B)** Electroforesis zonal para la separación de organelos con base a su carga neta y **(C)** Isotacoforesis para la separación de partículas de mayor tamaño con base a su movilidad electroforética.



---

## 7. ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio se analizó previamente la asociación de las proteínas de astrovirus con membranas, utilizando gradientes de densidad en iodixanol (Méndez *et al.*, 2007).

Las fracciones de los gradientes se analizaron por ensayos de "inmunoblot" y se encontraron la proteína estructural VP90 y las proteínas no estructurales la serin-proteasa y la RNA polimerasa en las fracciones de baja densidad del gradiente, lo que sugirió su asociación a membranas (Méndez *et al.*, 2007). Por otro lado, las fracciones separadas por el gradiente se analizaron por inmunomicroscopía electrónica y se observaron estructuras de forma similar a vesículas en las cuales se encontró el antígeno viral VP90, aunque por el tipo de corte realizado para esta técnica, en su análisis, no se puede asegurar si la proteína viral se encuentra en la periferia o dentro de estas vesículas (Méndez *et al.*, 2007). La replicación del RNA se evaluó en las fracciones de baja densidad del gradiente y se detectó tanto el RNAg como el RNAag (Méndez *et al.*, 2007), lo que sugiere que la replicación del virus se lleva a cabo en asociación al material presente en las fracciones de baja densidad.

A pesar de los avances que se han hecho en el estudio de los rearrreglos de membranas inducidos por virus de (+)RNA, la arquitectura de los rearrreglos inducidos por astrovirus no se conocen aun, sin embargo, hay reportes acerca del análisis ultraestructural por microscopía electrónica de células infectadas por HAsV-8, en los cuales se observan grandes grupos de partículas virales alrededor de estructuras similares a vesículas, las cuales han sido llamadas estructuras de "anillo" (Méndez *et al.*, 2007). Estas estructuras probablemente corresponden a las vesículas de doble membrana que han sido observadas en células Caco-2 infectadas con HAsV-4, con partículas virales dentro y en la periferia (Guix *et al.*, 2004).

Adicionalmente, se han observado otro tipo de estructuras en células Caco-2 infectadas con HAsV-8, las cuales son similares a aquellas encontradas en células HeLa infectadas con PV, las cuales se han descrito como "similares a cisternas", con un centro más

---

electrodensos y han sido denominadas estructuras de herradura (Schlegel *et al.*, 1996). Tanto para el caso de células infectadas por astrovirus o PV, se han encontrado las partículas virales alrededor de estas estructuras "de herradura". En el caso de PV, se identificaron por inmunomicroscopía electrónica las proteínas galT (galactosa-1-fosfato uridiltransferasa) de la red trans-Golgi, y lamp-1 (lysosome-associated membrane glycoprotein-1) de los lisosomas, en las estructuras de herradura (Schlegel *et al.*, 1996), lo que sugiere el origen de esas membranas.

En astrovirus se desconocen los organelos de los cuales se pueden originar las estructuras membranosas, aunque se ha sugerido la participación de membranas del retículo endoplásmico, ya que Guix *et al.* reportaron, por análisis de inmunofluorescencia, que la proteína nsp1a/4 se ubica a lo largo de la región perinuclear, lo cual fue confirmado por inmunomicroscopía electrónica, donde observaron esta proteína viral en el retículo endoplásmico (Guix *et al.*, 2004).

---

## 8. JUSTIFICACIÓN

Como se indicó en la introducción, además de factores virales, se ha demostrado que factores celulares participan en el ensamble del complejo de replicación y pueden estar directamente involucrados en la replicación del genoma o ensamble de virus de (+)RNA, lo cual puede ocurrir en asociación con estructuras membranosas, que en ocasiones son creadas *de novo*. Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que existe una asociación de las proteínas y RNA de astrovirus con membranas celulares durante la replicación del virus. Con estos antecedentes directos, el presente trabajo se enfocó a caracterizar en mayor detalle la interacción de los componentes de astrovirus (RNA, proteínas), y de las partículas virales infecciosas, con membranas celulares y a identificar proteínas celulares que pudieran estar involucradas en favorecer la replicación del virus en células Caco-2. Al comprender mejor la interacción entre astrovirus y la célula, se tendrá información que permita el estudio de posibles moléculas antivirales.

## 9. HIPÓTESIS

La replicación de astrovirus se lleva a cabo en asociación con membranas celulares provenientes posiblemente de diferentes organelos y este proceso requiere de diversos factores celulares.

---

## **10. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el tipo de membranas a las que se asocia astrovirus durante su replicación e identificar proteínas celulares necesarias para la replicación del virus.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Separar las poblaciones de membrana a la cual se asocian las proteínas y el RNA viral durante la replicación el virus.
- Identificar las proteínas celulares que se encuentran en las membranas a las cuales se asocia el virus durante su replicación.
- Determinar las vías metabólicas de las proteínas celulares identificadas.
- Determinar cuáles proteínas celulares pueden ser necesarias para la replicación de astrovirus.

---

## 11. MATERIALES Y MÉTODOS

**11.1. Células y virus:** La línea celular Caco-2 (ATCC American Type Culture Collection) se cultivó en medio Dulbecco modificado alto en glucosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.), suplementado con aminoácidos no esenciales (Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, California) y suero fetal bovino al 10% (Cansera) a 37° C y atmósfera de 10% CO<sub>2</sub>. La cepa de astrovirus Yuc8, aislada de un niño mexicano, se adaptó previamente para su crecimiento en la línea celular Caco-2 (Méndez-Toss et al., 2000). En este trabajo se utilizaron stocks virales de pases entre número 6 y 30. Para la propagación del virus, las células se lavaron tres veces con MEM sin suero fetal bovino e inoculadas con Yuc8 previamente tratado con 200 µg/ml de tripsina por 1 h a 37°C para una multiplicidad de infección de 0.01; una vez el virus se activó se agregó inhibidor de tripsina (200 µg/ml). La adsorción del virus a las células se realizó por 1 h a 37°C, el inoculo se removió y se agregó MEM sin suero. Las células infectadas se incubaron a 37°C y cosechadas 3 días post infección para los experimentos realizados en este trabajo.

**11.2. Anticuerpos y reactivos:** Los anticuerpos secundarios policlonales anti-conejo y anti-ratón acoplados a peroxidasa se compraron en Perkin Elmer Life Sciences (Boston, Massachusetts, U.S.A). El suero policlonal hecho en conejo dirigido contra astrovirus (cepa Yuc8) se obtuvo en el laboratorio como se describió previamente (Méndez *et al.*, 2004; Méndez-Toss *et al.*, 2000), así como también los sueros policlonales dirigidos contra las proteínas recombinantes 1a3 (residuos 401 a 638 de la proteína nsp1a) y la proteína 1b2 (residuos 201 a 362 de nsp1b), los cuales reconocen la proteasa y el motivo RNA polimerasa (Méndez *et al.*, 2003), respectivamente. Los RNA pequeños de interferencia (siRNA) se sintetizaron por la compañía Dharmacon Research (Lafayette, Colorado, U.S.A.) (Tabla anexa 1).

**11.3. Ensayo de infectividad:** Células Caco-2 confluentes se lavaron tres veces con medio MEM sin suero antes de ser infectadas con Yuc8 (la multiplicidad de infección se especifica en los resultados) previamente tratado con tripsina (200 µl/ml) por 1h a 37°C con el fin de

---

activar el virus (Méndez et al., 2002). Tras el tiempo de incubación, se agregó inhibidor de tripsina 400 µg/mL (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.) para prevenir el desprendimiento de las células durante la infección. Se colocó el inóculo viral (dependiendo el MOI requerido) sobre las células, las cuales se incubaron 1 h a 37°C y se cosecharon al tiempo indicado en cada experimento, fijándolas en metanol por 15 min a temperatura ambiente. Luego de la fijación se realizaron 3 lavados por 5 min con PBS y se agregó el anticuerpo anti Yuc (1:3000) por 2 h a 37°C. Después de 3 lavados por 5 min con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (1:5000) por 2 h a 37°C. Luego de tres lavados en PBS se agregó el sustrato de la peroxidasa 3-amino-9-etil-carbazol en buffer acetato y peróxido de hidrógeno como sustrato de la enzima y se incubó a temperatura ambiente hasta observar al microscopio la tinción roja característica en las células infectadas.

**11.4. Ensayo de rendimiento viral:** Después de realizar el experimento de silenciamiento con siRNAs e infección con astrovirus Yuc8, las células se sometieron a 3 ciclos de congelamiento (-20°C) y descongelamiento con el fin de liberar el virus del interior de las células. Luego se activó el virus con tripsina (ver sección 11.1) y se tituló sobre una monocapa confluyente de células Caco-2 como se indicó en la sección anterior.

**11.5. Fraccionamiento celular:** Con el fin de obtener las proteínas asociadas a membranas se realizaron gradientes de flotación en iodixanol (Optiprep®) (Axis Shield, Dundee Scotland). Las células Caco-2 confluentes en frascos de 150 cm<sup>2</sup> se infectaron con Yuc8 a una MOI de 5, las células control no infectadas se lavaron y conservaron en incubación con medio MEM sin suero. Dieciocho horas post infección las células se lavaron dos veces con PBS frío y una vez con buffer HEPES-sacarosa (HSB; 50 mM HEPES, pH 7.4, 250 mM sacarosa). Las células se incubaron en hielo por 10 min con 5 ml de buffer HSB y luego se desprendieron con ayuda de un gendarme, y posteriormente se recolectaron en un tubo de policarbonato de 15 ml; el frasco se lavó 2 veces (con 5 ml de HSB) con el fin de recuperar el mayor número de células posible y se centrifugaron a 1,500 x g por 10 min. La

---

pastilla se resuspendió en 0.5 ml de buffer HSB frío, se agregó inhibidor de proteasas (Roche, Basel Schweiz) y se rompieron las células con el homogenizador Dounce con 50 movimientos. El contenido del tubo del homogenizador se extrajo con pipeta Pasteur y se centrifugó a 1,500 x g por 10 min para separar los núcleos y las células no rotas. El extracto libre de núcleos se mezcló con iodixanol al 60% alcanzando una concentración final de 40%. Se preparó el gradiente discontinuo de flotación con iodixanol diluido en buffer HSB. El gradiente se realizó en tubos de 5 ml para el rotor SW50.1 Beckman desde la base del tubo hacia la parte superior de la siguiente manera: 1.2 ml de iodixanol al 40% (mezcla de extracto libre de núcleos y iodixanol al 60%), 1.5 ml de iodixanol al 35%, 0.8 ml de iodixanol al 30%, 0.8 ml de iodixanol al 20% y 0.8 de iodixanol al 15%. Los tubos se ultracentrifugaron por 4 h a 150,000 X g (rotor SW50.1 Beckman) a una temperatura de 4°C. Después de la ultracentrifugación se observaron tres bandas opalescentes por encima de donde se colocó el iodixanol al 30%. Las tres bandas se recolectaron con pipeta desde la parte superior del tubo y se conservaron a -80°C hasta que se alcanzó una concentración de proteína de 30 mg/7ml. Se utilizaron alrededor de 40 frascos de 150 cm<sup>2</sup> para las células no infectadas y 40 frascos de 150 cm<sup>2</sup> para las células infectadas. La concentración de proteína se calculó por el ensayo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Cat. 500-0006) y se confirmó la presencia de proteína viral por medio del ensayo de detección Western blot utilizando el anticuerpo policlonal anti-Yuc8.

**11.6. Separación de membranas por Electroforesis Zonal de Flujo Libre (FFZE):** Las proteínas asociadas a membranas separadas por gradientes de densidad en iodixanol se fraccionaron por FFZE utilizando el sistema BD FFE (BD Proteomics) (Barkla *et al.*, 2007). La muestras de proteína asociadas a membranas de células infectadas y no infectadas se inyectaron continuamente con una bomba peristáltica a una tasa de flujo de 2 ml/h usando la manguera de entrada de la muestra anódica. Las mangueras de entrada de la cámara contenían las siguiente soluciones amortiguadoras: entradas del 2 al 6, medio de separación (10 mM TEA, 10 mM ácido acético, 2 mM KCl, y 250 mM sacarosa); entradas del 1 al 7, medio de estabilización (40 mM TEA, 40 mM ácido acético, 8 mM KCl, y 180 mM

---

sacarosa). Las soluciones de electrolitos catódica y anódica consistieron en 100 mM TEA, 100 mM ácido acético y 20 mM KCl ajustado a pH 7.4 con NaOH, y 0.4% formaldehído adicionado al buffer anódico para prevenir la pérdida de cloro por oxidación anódica. EL medio de flujo de contracorriente de las entradas C1, C2 y C3 fue el mismo utilizado como medio de separación. La electroforesis FFZE fue llevada a cabo en el modo horizontal a un voltaje constante de 750 V (150 mA), a una tasa de flujo de 250 ml/h para el flujo de contracorriente. La temperatura durante la corrida se mantuvo a 5°C.

Tras la separación en la cámara, las membranas fraccionadas se recolectaron continuamente en placas de 96 pozos profundos (4 ml/pozo; Sunergia Medical). La separación fue monitoreada colectando muestras en placas de 96 pozos en varios puntos durante la corrida y se midió la cantidad de proteína ( $A_{280}$ ) usando el espectrofotómetro (Power WaveX; Bio-Tek Instruments). Las proteínas virales se detectaron en las 96 fracciones por ensayos de ELISA (ver siguiente sección). Con base en la presencia de las proteínas virales se decidió agrupar las muestras en pares. Para esto, el volumen total de dos fracciones se reunió en un tubo para el rotor SW28 Beckman y se concentraron las proteína asociadas a membranas por ultracentrifugación a 25000 rpm (82000 x g) por 5 h a una temperatura de 4°C. Las pastillas resultantes de las membranas con sus proteínas asociadas se resuspendieron en 150  $\mu$ l de buffer TN (Tris 50mM pH 7.4, NaCl 150 mM) y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis por medio de Western blot.

**11.7. Detección de proteínas por ensayo ELISA:** La presencia de proteínas virales se evaluó en las 96 fracciones separadas por FFZE mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se incubaron 50  $\mu$ l de cada una de las 96 fracciones en placas de ELISA durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día se lavó la placa tres veces por 5 min con PBS-BSA al 1% y se bloqueó con este buffer por 1 h a temperatura ambiente. Luego se colocaron 50  $\mu$ L de anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-Yuc (dirigido contra la proteína VP90), anti-E4 (residuos 666 a782 de la proteína VP90) o anti-1a3 (residuos 401 a 638 de la proteína nsp1a). Tras incubar toda la noche a 4°C, la placa fue lavada 3 veces con PBS-BSA 1% e incubada por 1 h a 37°C con 50  $\mu$ L de inmunoglobulina G (IgG) anti-conejo



---

conjugada con fosfatasa alcalina. La placa se lavó tres veces con PBS-BSA al 1% y se incubó con 1 mg/ml de sustrato de la fosfatasa alcalina (p-nitrofenilfosfato) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.) en 1 mM MgCl<sub>2</sub> y buffer dietanolamina pH 9.8 al 1% a temperatura ambiente hasta que el control positivo (lisado viral) obtuvo un color amarillo intenso (A<sub>405</sub> de 1, aproximadamente).

**11.8. Inmunoblots:** Las muestras de proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas Immobilon NC (Millipore Billerica, Massachusetts, U.S.A.) por 1h a 50 V en buffer CAPS (10 mM CAPS [pH 11] [3-(ciclohexilamino)-1-propano ácido sulfónico]; 10% methanol. Las proteínas transferidas a la membrana se visualizaron por tinción con rojo Ponceau. La membrana se lavó con agua destilada hasta que el rojo Ponceau fue retirado completamente para después bloquear con leche descremada al 5% en buffer Tris (50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 150 mM NaCl) más Triton 0.1% (TBS-T) por 1 h a 37°C. Después de la incubación la membrana se lavó 3 veces con TBS-T y se incubó con el anticuerpo primario (indicado en cada experimento) durante toda la noche en agitación a 4°C. La membrana se lavó 3 veces en buffer TBS-T y se incubó con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa por 1h a temperatura ambiente en agitación. La membrana se reveló por el sistema luminol Western Lightning system (PerkinElmer, Waltham Massachusetts, U.S.A.).

**11.9. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS):**

Después de la separación de las membranas por FFZE se analizó la presencia de proteínas y RNA viral y se seleccionaron las fracciones 17-18 (Población I) , 44-45, 46-47, 48-48, 52-53 (Población II) y 78-79 (Población III) para su caracterización por LC-MS/MS. Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético y acetona; para esto, de cada fracción se tomaron 600 µL (1,200 µL por las dos fracciones) y se mezclaron con 240 µL de Tris-EDTA (10 mM Tris HCl, 1mM EDTA pH 8.0), 100 µL 0.3% deoxicolato de sodio y 100 µL de 72% TCA. Las muestras se mantuvieron en hielo por 1 h y posteriormente se centrifugaron

---

a 1,500 x g por 20 min a 4°C. Se aspiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en acetona al 90% a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron toda la noche a -20°C; al día siguiente las muestras se centrifugaron a 1,500 x g por 20 min a 4°C, se aspiró el sobrenadante y las muestras se secaron en el desecador (the Savant Integrated SpeedVac System) por 20 min.

Las muestras se analizaron por nano LC-MS/MS en la unidad de proteómica del Institut de Recherches Clinique (Montreal, Quebec, Canadá), como se describió previamente (Barkla *et al.*, 2012). Las muestras de proteínas digeridas con tripsina se re-solubilizaron bajo agitación por 15 min en 10 µL de ácido fórmico al 0.2%. Las muestras digeridas se desalaron usando puntas C18 (ZipTip pipette tips (Millipore, Billerica, Massachusetts, U.S.A.)). Los eluidos se secaron en una centrifuga de vacío y luego re-solubilizados bajo agitación por 15 min en 10 µL de acetonitrilo al 2%/ácido fórmico al 1%. La columna para la cromatografía (columna C18) fue empacada por fase reversa. Adicionalmente, la columna para el nanospray fue la columna Self-Pack PicoFrit (New Objective, Woburn, Massachusetts, U.S.A.) de 15 cm de longitud, la cual fue empacada con material C18 Jupiter (Phenomenex, Torrance, California, U.S.A.). Esta columna fue instalada sobre el sistema Easy-nLC II (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) y acoplada al espectrómetro LTQ Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) equipado con una fuente de iones nanoelectrospray Proxeon. Los buffer usados para la cromatografía fueron: buffer A: ácido fórmico al 0.2% y buffer B: 100% acetonitrilo/0.2% ácido fórmico. Durante los 12 primeros min se cargaron 5 µL de la muestra en la columna a una tasa de flujo de 600 nL/min, el gradiente se fue incrementando de 2% a 80% del buffer B en 110 min a una tasa de flujo de 250 nL/min y luego se regresó a las condiciones de 600 nL/min y 2% buffer B por 10 min. La resolución de la masa para el MS fue de 60.000 (m/z 400). La proporción masa/carga fue de 380 a 2000 para MS con un valor blanco de 1.000.000 de cargas y desde ~1/3 de la proporción padre m/z a 2000 para MS/MS con un valor blanco de 10.000 cargas. Los voltajes del nanospray y S-lentes fueron de 0.9–1.8 kV y 50 V, respectivamente. La temperatura capilar fue de 225°C. Las condiciones de MS/MS de la energía de colisión normalizada de 35V, activación Q, 0.25; tiempo de activación 10ms.

---

**11.10. Búsqueda en las bases de datos:** Los datos de la espectrometría de masas fueron extraídos por el software Mascot Daemon versión 2.2.2. Todas las muestras de MS/MS se analizaron usando los programas Mascot (Matrix Science, London, UK) y X! Tandem (The GPM, thegpm.org; versión 2007.01.01.1). En Mascot se dio como criterio buscar ipi\_HUMAN\_v3\_87 database (91464 entradas). En Mascot y X! Tandem se utilizó para la búsqueda una tolerancia de 0.60 Da y una tolerancia del ion padre de 15 ppm. Se especificó las derivaciones de iodoacetamida de las cisteínas en Mascot y X! Tandem como modificación fija y la oxidación de metionina se especificó como modificación variable.

**11.11. Criterios para la identificación de proteínas:** Se utilizó el programa Scaffold (versión Scaffold\_3.1.2, Proteome Software Inc., Portland, Oregon, U.S.A.) para validar el ensamble de péptidos y la identificación de las proteínas. La identificación de los péptidos fue aceptada si se excedía los criterios límites de búsqueda. La identificación en Mascot requería que la puntuación de los iones fuera mayores que la puntuación de la identidad de los iones 20, 15, y 15 para doble, triple y cuádruple péptido cargados. Las identificaciones en X! Tandem requirieron al menos una puntuación de  $-\text{Log}(\text{Expect})$  mayor a 2.0. Las identificaciones de los péptidos fueron aceptadas si se podía establecer una probabilidad mayor a 95% como se especifica en el Peptide Prophet algorithm (Keller *et al.*, 2002). La identificación de proteínas se aceptó si correspondía al 99.0% de probabilidad y contenían al menos dos péptidos únicos (Nesvizhskii *et al.*, 2003). Las proteínas que contenían péptidos similares y no pudieron ser diferenciados con base al análisis MS/MS fueron agrupadas para satisfacer el principio de parsimonia. Todas las secuencias de los péptidos de nano-LC-MS/MS, números de acceso, cobertura de la secuencia de la proteína, el peso molecular, el número de péptidos únicos y la probabilidad de identificación de la proteína, así como otra información relevante se proveen en las tablas que se adjuntan en un CD.

---

### **11.12. Construcción y análisis de redes de interacción proteína-proteína:**

Con el fin de ubicar las proteínas identificadas en una red de interacción proteína-proteína, los datos de interacción de proteínas se recopilaron de la base de datos STRING (<http://string.embl.de/>) (von Mering *et al.*, 2003), la cual incluye evidencia experimental de la interacción entre proteínas, bases de datos de interacción de proteínas y co-ocurrencia de minería de texto. Las redes de interacción proteína-proteína se visualizaron usando el programa Cytoscape (versión: 3.0.2) (<http://www.cytoscape.org>) (Cline *et al.*, 2007) y el enriquecimiento estadístico para las anotaciones GO se determinó usando la aplicación para Cytoscape, ClueGO (Bindea *et al.*, 2009).

**11.13. Transfección de siRNA:** Todos los siRNA usados para silenciar la expresión de genes celulares fueron siGENOME SMARTpool® de Dharmacon RNAi Technologies (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.). Los siRNA se transfectoron en las células Caco-2 utilizando el sistema de electroporación Amaxa (nucleofector) (Amaxa, Cologne, Germany), según las indicaciones del fabricante. Para la electroporación se utilizó 1.5 millones de células y 1.5 mg de siRNA. Setenta y dos horas después de la electroporación, se removió el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con medio MEM y se infectaron con astrovirus Yuc8. Dieciocho horas post-infección se retiró el medio a las células, se lavaron 2 veces con MEM y se cosecharon en buffer Laemmli para su análisis por Western blot o en TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A.) para aislamiento de RNA.

**11.14. Análisis de RNA viral:** Se obtuvo el RNA de las fracciones separadas por FFZE por extracción con TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A.). A partir del RNA total se sintetizó cDNA con la enzima Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, California) con los oligonucleótidos Mon344(+) o Mon343(-) (Tabla anexa 2) (Belliot *et al.*, 1997) a 42°C por 40 min. Después de este tiempo de incubación se inactivó la enzima calentando las muestras a 85°C por 10 min. El PCR se llevó a cabo con el mismo par de oligonucleótidos y la enzima Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, U.S.A.). Las

---

condiciones de la reacción fueron de 15 ciclos (30 s a 94°C, 30 s a 55°C, y 30 s a 72°C). Los productos de amplificación de PCR de 318 nucleótidos (nt) se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio para visualizarlos.

**11.15. Ensayos de PCR cuantitativo (qRT-PCR):** El RNA total extraído de las células se trató con DNasa libre de RNasas (Roche, Basel, Switzerland) para eliminar la posible contaminación con DNA. El PCR cuantitativo (qRT-PCR) se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del kit para síntesis de cDNA de Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix protocol (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A.). El análisis cuantitativo de los datos se llevó a cabo utilizando el programa "Prism 7000 analysis" (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, U.S.A.). Los oligonucleótidos usados para amplificar los genes celulares *GAPDH*, *ARF6*, *ARL1*, *DHCR7*, *CYP51A1*, *FASN*, *PI4KIII α*, *PI4KIII β*, *CDS2*, *ITPR3*, *DDX23* y *EIF6* y el ORF1b de astrovirus Yuc8 se muestran en la Tabla anexa 2. Los resultados se normalizaron con los niveles detectados de mRNA de GAPDH (gen de referencia) en cada muestra. Los cambios relativos en la expresión de los genes se calcularon por el método  $2^{-\Delta CT}$ , donde CT es el ciclo de corte (Livak *et al.*, 2001). Los resultados presentados provienen de 3 experimentos independientes y se determinó la significancia estadística con la prueba de t de Student a dos colas. Cada réplica biológica fue probada por triplicado y los datos se normalizaron respecto al gen de referencia *GAPDH*.

**11.16. Microscopía electrónica:** Los análisis de microscopía electrónica se realizaron en la Unidad de Microscopía electrónica del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Autónoma de México (UNAM) por Guadalupe Zavala. Para estos análisis, las células infectadas con astrovirus Yuc8 (células sin infectar se usaron como control) se cosecharon a 18 hpi. Las células se lavaron 3 veces con PBS (temperatura ambiente) y se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en cacodilato de sodio (pH 7.2) 50 mM que además contiene KCl 1M, MgCl<sub>2</sub> 0.1M, CaCl<sub>2</sub> 0.1M, y sacarosa 2% por 30 min. Las células se lavaron 5 veces (por 5 min cada lavado) con cacodilato de sodio 50 mM y fueron post fijadas con OsO<sub>4</sub> al 2% en

---

50 mM cacodilato de sodio por 40 min, en hielo, en la oscuridad. Las células se lavaron con agua durante toda la noche, y al día siguiente se trataron con 0.5% acetato de uranilo disuelto en agua por 30 min, se lavaron con agua y se deshidrataron a temperatura ambiente en lavados seriados de etanol al 40, 50, 60, 70 y 80% por 5 min cada lavado, seguidos de lavados con etanol al 95% y 100% por 20 min. Las células se sumergieron posteriormente en óxido de propileno al 100% e inmediatamente se embebieron en la resina araldita-Epon (Araldite 502/Embed 812 kit; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, U.S.A.). La polimerización se llevó a cabo a 60°C por dos días, se removieron los cubre objetos y la monocapa de células embebidas se seccionó en cortes de 65 nm usando un ultra micrótomo (Ultracut R; Vienna, Austria) y cuchilla de diamante. Los cortes fueron contra teñidos con 3% de acetato de uranilo en 70% de metanol por 5 min y 2% de citrato de plomo en agua por 2 min. Los cortes se examinaron en el microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900 a 60 kV (Gatan, Inc., Pleasanton, California, U.S.A.)

**11.17. Inmunomicroscopía electrónica:** Los análisis de microscopía electrónica se realizaron en la Unidad de Microscopía electrónica del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Autónoma de México (UNAM) por Guadalupe Zavala. Para estos análisis, las células infectadas y no infectadas (control) se fijaron en paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.1% en PBS y se obtuvieron cortes (ver sección anterior) que se embebieron en la resina LR-White, seguida por deshidratación seriada en etanol. Los cortes se colectaron en rejillas de níquel y se incubaron con el anticuerpo primario anti1b-2 dirigido contra la RNA polimerasa viral, por 1 h a temperatura ambiente. Las rejillas se lavaron 5 veces y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra (IgG) marcado con oro coloidal de 15 nm diluido 1:10 en PBS por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las rejillas se lavaron con PBS y agua destilada y se tiñeron con acetato de uranilo.

---

## **12. RESULTADOS**

### **12.1. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A MEMBRANAS DE LAS CÉLULAS CACO-2 INFECTADAS CON ASTROVIRUS YUC8**

#### **12.1.1. Separación de las proteínas asociadas a membrana mediante gradientes de densidad en iodixanol**

Con el fin de separar las proteínas asociadas a membranas utilizamos inicialmente gradientes de densidad en iodixanol, como lo reportamos previamente (Méndez et al., 2007). Para esto las células Caco-2 confluentes se infectaron con astrovirus Yuc8 (el control fueron células no infectadas) y a las 18 hpi se obtuvo el extracto celular libre de núcleos utilizando un homogenizador Dounce (ver materiales y métodos) y se montó el gradiente de densidad en iodixanol (Figura II.1A). Tras someter las muestras a ultracentrifugación se observaron tres bandas en la parte superior del tubo, las cuales corresponden a fracciones de baja densidad que probablemente contengan fragmentos de membranas con sus proteínas asociadas (Figura II.1B). Las tres bandas se recolectaron con pipeta desde la parte superior del tubo, se cuantificó la cantidad de proteína mediante el método de Bradford y las muestras se conservaron a -80 °C hasta tener una cantidad total de proteína de 30 mg.

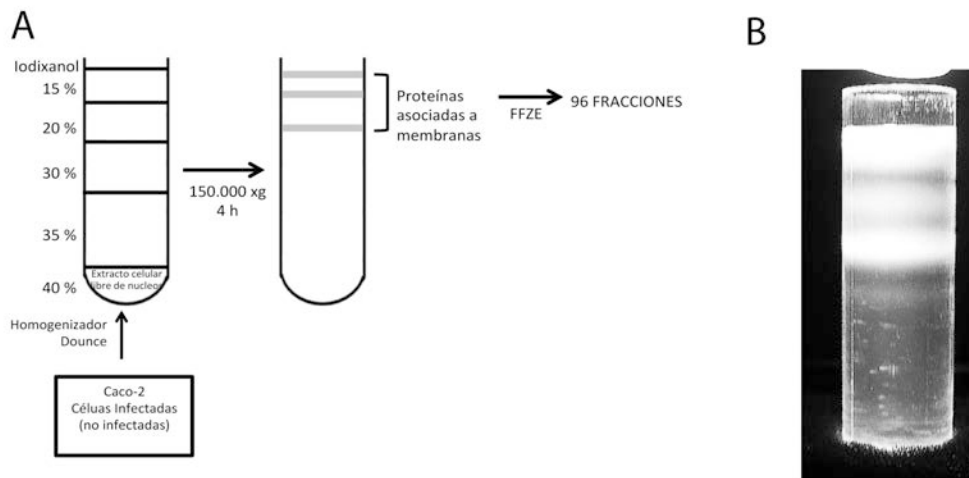
#### **12.1.2. Fraccionamiento de las proteínas asociadas a membrana mediante Electroforesis Zonal de Flujo Libre (FFZE)**

Nuestro laboratorio había reportado previamente la presencia de la RNA polimerasa (RNAPol) de astrovirus en fracciones de baja densidad de gradientes de iodixanol (Méndez *et al.*, 2007), lo que sugirió una asociación de esta proteína con membranas. Para separar de manera más fina las membranas donde la RNAPol de astrovirus pudiera estar localizada, las bandas recolectadas de los gradientes de iodixanol que se obtuvieron en el

presente trabajo, se sometieron a electroforesis zonal de flujo libre (FFZE por sus siglas en ingles). Esta técnica permite la separación de diferentes membranas en 96 fracciones, con base en la carga neta de las proteínas asociadas a ellas durante su recorrido en un flujo laminar, a través de una capa acuosa delgada (Barkla *et al.*, 2007). Esta técnica de fraccionamiento es altamente reproducible y ha sido adaptada para la separación de células, organelos, membranas y proteínas en diferentes organismos y tipos celulares (Weber *et al.*, 2004).

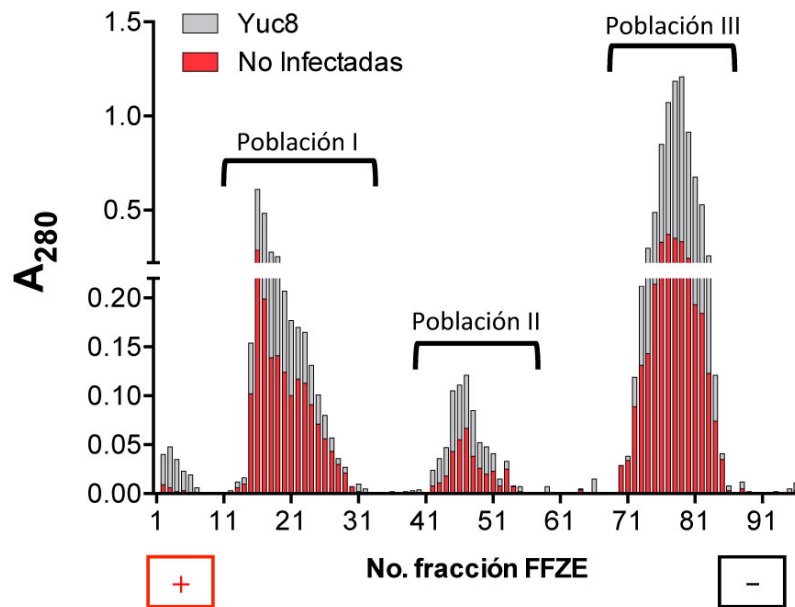
La muestra, consistente de 30 mg de proteína, en un volumen de 7 ml, se inyectó en el equipo BD FFE (BD Proteomics). La muestra de células infectadas y células no infectadas se separaron en 96 fracciones (Figura II.1). En la figura 2 se observan tres picos claramente definidos que corresponden a tres poblaciones de membranas (denominadas I, II y III) tanto en células infectadas como no infectadas. Sin embargo se observaron diferencias entre ambas condiciones a juzgar por el desplazamiento y en la concentración de proteínas presentes en estas poblaciones.

□



**Figura II.1. Separación de proteínas asociadas a membranas. (A)** Células Caco-2 se infectaron con astrovirus Yuc8 (MOI 5), 18 hpi se obtuvo el extracto citosólico libre de núcleos (también para células mock) el cuál fue fraccionado por ultracentrifugación en gradientes de densidad de iodixanol. Después de la ultracentrifugación se recolectaron las tres bandas localizadas en la parte superior del tubo y se separaron por FFZE. **(B)** Localización de las proteínas asociadas a membranas después en el gradiente de densidad en iodixanol tras la ultracentrifugación.





**Figura II.2. Separación de las membranas de células Caco-2 por electroforesis zonal de flujo libre (FFZE).** Las proteínas asociadas a membranas de células no infectadas e infectadas con astrovirus Yuc8 fueron colectadas a partir de gradientes de iodixanol y separadas por FFZE. La  $A_{280}$  fue medida en cada fracción colectada como un indicador de la presencia de proteína. Las barras rojas representan las muestras de células no infectadas y las barras grises de células infectadas. La figura es representativa de 3 réplicas biológicas.

### 12.1.3. Evaluación de la presencia de componentes de astrovirus Yuc8 en las poblaciones de membrana separadas por FFZE.

Para determinar la presencia de componentes virales en las tres poblaciones de membranas, se evaluó la presencia de proteína, RNA y partículas virales en todas las fracciones de las tres poblaciones obtenidas de membrana.

---

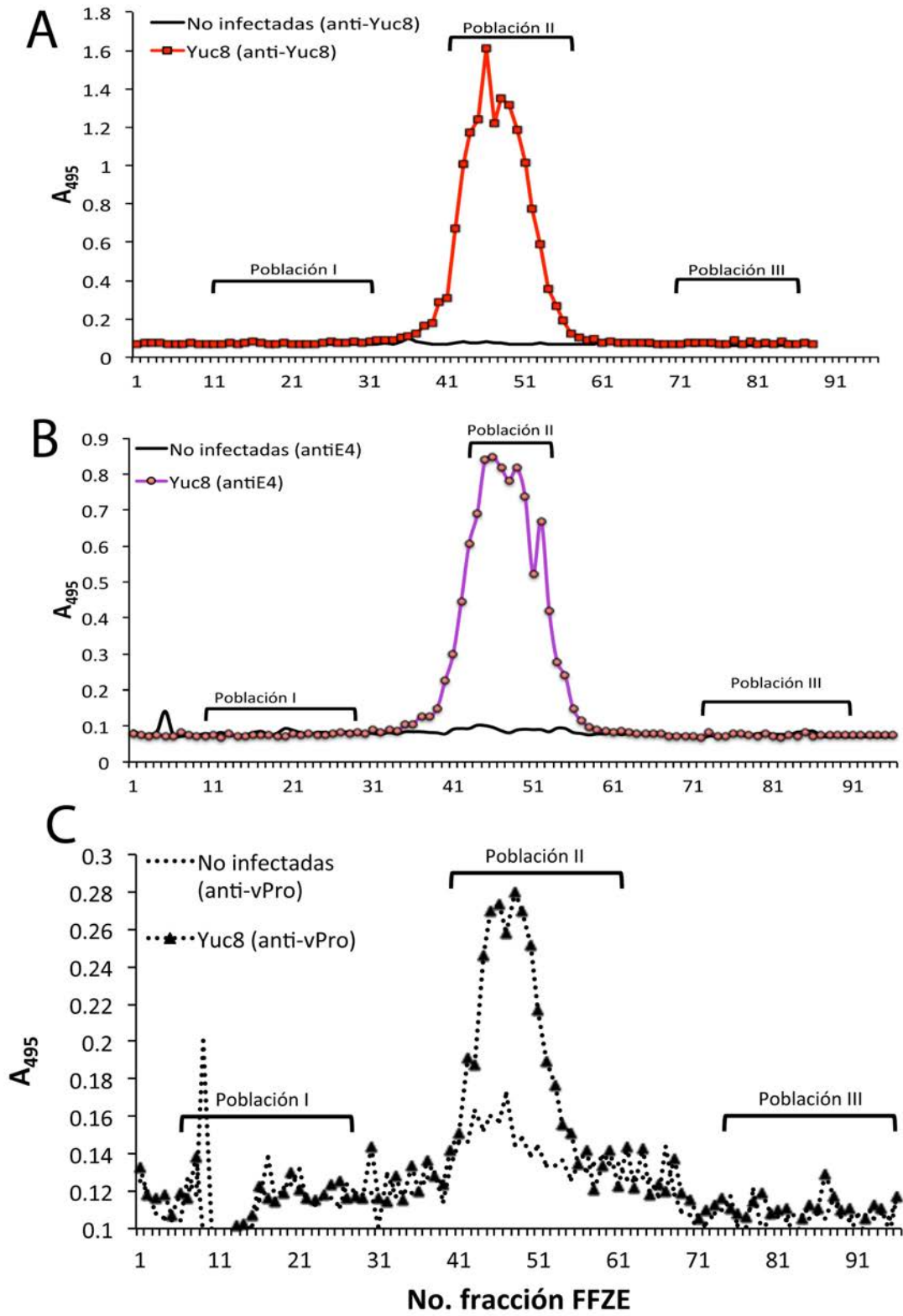
#### **12.1.4. Evaluación de la presencia de las proteínas virales en las fracciones de membrana separadas por FFZE**

La presencia de proteínas virales en las 96 fracciones separadas por FFZE se realizó por medio de un ensayo de ELISA. La proteína estructural VP90 fue detectada con el anticuerpo anti-Yuc8 solamente en la población II, entre las fracciones 40-60 (Figura II.3A), lo que se confirmó utilizando el anticuerpo antiE4, el cual está dirigido contra el extremo carboxilo terminal de VP90 (Figura II.3B). La proteína no estructural nsp1a fue detectada en las mismas fracciones con el anticuerpo anti-1a3 generado contra el motivo de proteasa de la poliproteína nsp1ab (Figura II.3C).

Además de lo anterior, se analizó la presencia de proteínas virales en las diferentes fracciones por ensayos de Western blot. Para esto, se analizaron fracciones combinadas de dos en dos, concentradas por ultracentrifugación. Se emplearon los anticuerpos anti-Yuc8, anti-RNapol (anti1b2) y anti-proteasa (anti-1a3). En la Figura II.4 se observa que la proteína VP90 y las proteínas no estructurales RNapol y proteasa fueron detectadas solamente en fracciones de la población II, lo que confirma los resultados obtenidos al utilizar el ensayo de ELISA.

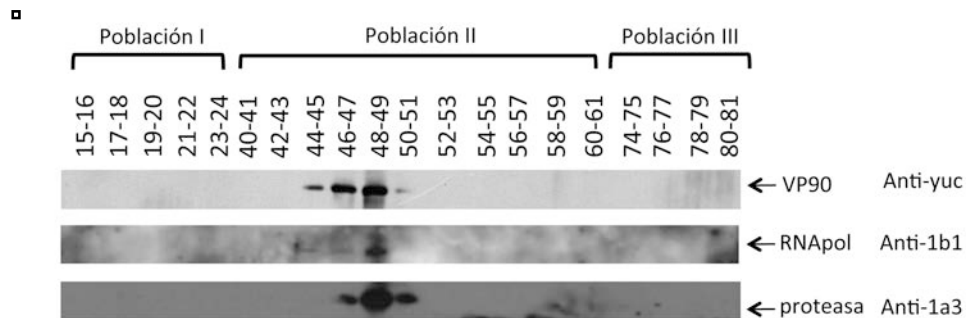
El anticuerpo anti-Yuc8 puede detectar no solamente las poliproteínas estructurales VP90 y VP70, sino también los productos de corte con tripsina de VP70 (Méndez *et al.*,2002). Estos productos de corte pueden aparecer en las partículas virales activadas por tripsina o cuando la proteína ha sufrido cortes proteolíticos por proteasas durante los pasos de separación y purificación.

□



**Figura II.3. Inmunodetección de antígenos virales en las fracciones FFZE.** Las muestras separadas por FFZE fueron evaluadas por ELISA con anticuerpos dirigidos contra la proteína estructural VP90 (anti Yuc8) **(A)**, el extremo carboxilo terminal de VP90 (anti E4) **(B)** y contra la proteasa viral (anti 1a3) **(C)**.

En los ensayos de Western blot realizados apareció principalmente una banda correspondiente a VP90 y en algunas fracciones se detectó VP70; por el contrario, no se detectó ninguno de los productos finales de corte de la poliproteína estructural.



**Figura II.4. Detección de las proteínas virales en las fracciones FFZE.** Las fracciones separadas por FFZE fueron agrupadas de a dos y ultracentrifugadas. La proteína concentrada fue analizada por inmunoblot con los anticuerpos anti-Yuc8 (VP90), anti-RNAPol (anti1b1) y anti-proteasa (anti-1a3) indicados con flechas en la figura.



**Figura II.5. Detección del RNA viral en las fracciones FFZE.** Se extrajo el RNA de las fracciones separadas por FFZE, se realizó la reacción de retrotranscripción con los oligonucleótidos Mon343(arriba) para detectar el RNA anti genómico (RNAag) o Mon344 (abajo) para detectar el RNA genómico (RNAg). La reacción de PCR se llevó a cabo con el mismo par de oligonucleótidos. Se muestra una figura representativa de tres repeticiones.

#### 12.1.5. Evaluación de la presencia del RNA viral en las fracciones de membrana separadas por FFZE

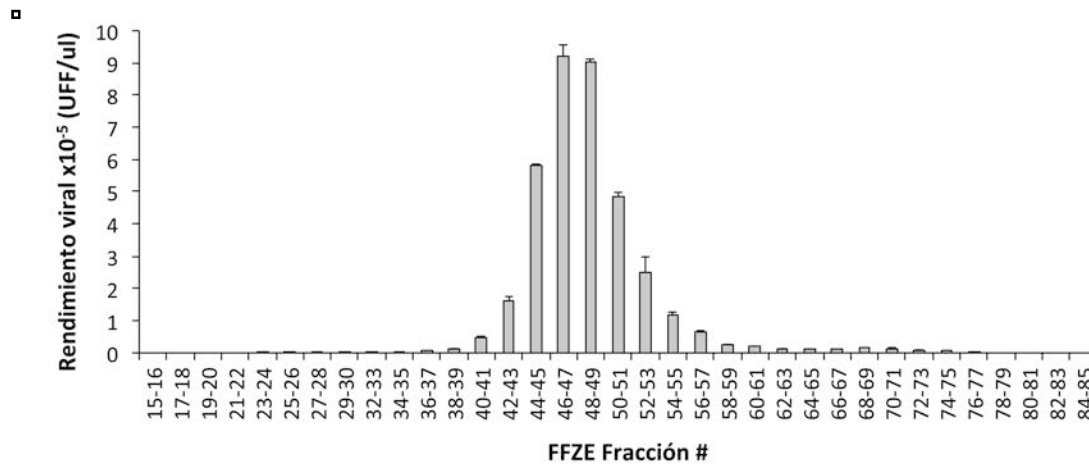
Si el ciclo de replicación de astrovirus se está llevando a cabo en estructuras de membrana, es posible que el RNA recién sintetizado se encuentre asociado a ellas. Para probar esta hipótesis se determinó la presencia de la hebra negativa [RNA anti-genómico (RNAag)] y la hebra positiva [(RNA genómico (RNAg))] virales mediante PCR semicuantitativo. La reacción de retrotranscripción se realizó con los oligonucleótidos Mon 343 o Mon 344 (Belliot et al., 1997) para producir cDNA a partir de la hebra negativa o positiva de RNA, respectivamente. Después de la inactivación de la transcriptasa reversa, el cDNA sintetizado fue amplificado por PCR. Como se muestra en la figura II.5, tanto el RNA genómico como anti-genómico se detectaron en las fracciones 44 a 49. La cantidad relativa de la fracción 48-49 es mayor a juzgar por la intensidad de la banda. La presencia de ambas especies de RNA respalda la idea de que la replicación del RNA puede estar ocurriendo en membranas presentes en la población II.

---

### 12.1.6. Evaluación de la presencia de partículas virales infecciosas en las fracciones de membrana separadas por FFZE

Una vez que se detectaron las proteínas estructurales y no estructurales, así como el RNA genómico y anti-genómico, se determinó si en las fracciones se encontraban partículas virales infecciosas, para ello, las fracciones se trataron con tripsina (200 µg/ml) con el fin de activar el virus presente y se probó su infectividad sobre una monocapa de células Caco-2. El mayor título viral se encontró en las fracciones 46-47 y 48-49 (población II) (Figura II.6). Aunque en algunas fracciones de las poblaciones I y III se detectó virus infeccioso, la cantidad fue mucho menor comparado al encontrado en las fracciones de la población II.

Estos resultados muestran que la replicación del RNA y el ensamble de nuevas partículas virales se está llevando a cabo en la población II, particularmente en las fracciones 46-47 y 48-49 donde la cantidad relativa de proteínas, RNA (genómico y anti-genómico) y las partículas virales es mayor respecto a otras fracciones.



**Figura II.6. Detección del rendimiento viral en las fracciones FFZE.** Las fracciones separadas por FFZE fueron tratadas con tripsina (200µg/ml) y se determinaron las partículas infecciosas presentes en las fracciones como unidades formadoras de foco (UFF/ml) utilizando un anticuerpo anti Yuc8.

---

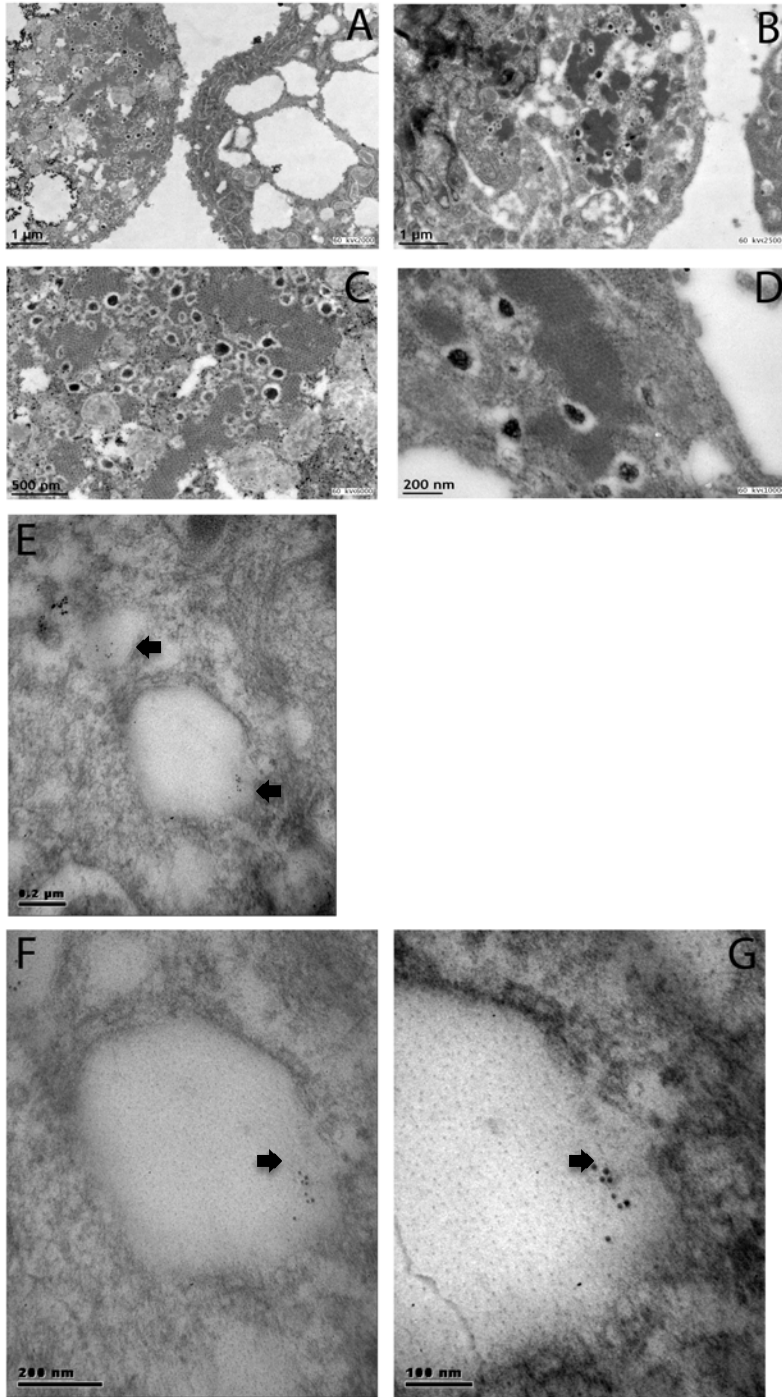
## **12.2. Estudio preliminar de la localización de la RNAPol de astrovirus Yuc8 por microscopía electrónica.**

Se ha descrito que la proteína estructural VP90 y las partículas virales se asocian a membranas en células Caco-2 (Guix et al., 2004; Méndez et al., 2007). Para evaluar con más detalle la localización de las partículas se observó la ultraestructura de las células infectadas por microscopía electrónica.

Las células Caco-2 fueron infectadas con astrovirus Yuc8 y a las 18 hpi se fijaron para ser tratadas para observación por microscopía electrónica. En las células infectadas se observaron estructuras de semicírculo con una zona más electrodensa en su centro (Figura II.7A y II.7B); en algunas de estas estructuras se observa una abertura o comunicación con el citosol (Figura II.7C y II.7D). Las partículas virales se observan organizadas en un arreglo paracrystalino, alrededor de las estructuras de semicírculos (Figura II.7C y II.7D).

Adicionalmente se evaluó por inmunomicroscopía electrónica la localización de la RNA polimerasa y se encontró la tinción de oro, correspondiente a la localización del antígeno identificado con el anticuerpo anti 1b2, dentro de lo que parecen ser vesículas (Figura II.7E, II.7F, II.7G).

□





---

**Figura II.7. Localización intracelular de astrovirus Yuc8.** Células Caco-2 fueron infectadas con astrovirus Yuc8 y a las 18 hpi fueron procesadas para microscopía electrónica como se describe en Materiales y Métodos. Se realizó la tinción de acetato de uranilo (A-D) e inmunomicroscopía electrónica, utilizando como anticuerpo primario anti1b2 (dirigido contra la RNAPol) (F-G). Las flechas negras indican la presencia del anticuerpo secundario acoplado a partículas de oro.

### **12.3. ANALISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS FRACCIONES SEPARADAS POR FFZE**

Una vez que localizamos las proteínas y el RNA viral, así como las partículas virales solamente en la población II de membranas, usamos espectrometría de masas (LC-MS/MS) para identificar las proteínas celulares asociadas a estas fracciones, ya que algunas de ellas podrían tener alguna función en la replicación del RNA viral o en el ensamble de las partículas virales.

#### **12.3.1. Identificación de proteínas celulares por espectrometría de masas (LC-MS/MS)**

De las fracciones de FFZE en las que se detectaron los componentes virales, se seleccionaron las fracciones 44-45, 46-47, 48-49, 52-53 para su análisis. También se incluyeron, como control, las fracciones 17-18 y 78-79 de las poblaciones I y III, respectivamente, tanto de las células infectadas como no infectadas. Estas fracciones fueron analizadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en un espectrómetro Orbitrap, lo que permite la pre-separación de proteínas y péptidos, conocida como tecnología multidimensional de identificación de proteína (MudPIT, por sus siglas en inglés,) y también llamada tecnología proteómica de escopeta o “shotgun” (Figura II.8). Esta técnica se utiliza para identificar proteínas a partir de una mezcla compleja.

---

La lista de iones fragmentados fue ensamblada con la base de datos de proteínas humanas. En total se identificaron 1539 y 1502 proteínas en las células no infectadas e infectadas, respectivamente (Tablas S1 y S2). De estas proteínas, un total de 812 y 796 proteínas (excluyendo las proteínas no identificadas) fueron identificadas con un valor de alta confiabilidad, con un mínimo de dos péptidos y un 95% de probabilidad de identificación (Tablas S3 y S4). De las proteínas identificadas encontramos que la mayoría se comparten entre las muestras de células infectadas y no infectadas (670 proteínas, 41.4%) (Figura II.9), mientras que el número de proteínas identificadas exclusivamente en las fracciones de las células no infectadas e infectadas fueron de 142 y 126 respectivamente, (figura II.6 y Tabla S5).

### **12.3.2. Distribución de las proteínas celulares en las tres poblaciones de membrana**

Las proteínas totales identificadas fueron analizadas con base a su localización en las 3 poblaciones de membrana obtenidas. En la figura II.10 se observa que el mayor número de proteínas se encuentra en la población II (fracción 48-49) con un total de 660 y 615 para las células no infectadas e infectadas, respectivamente. Entre las tres poblaciones el número de proteínas compartidas es bajo: del 0.25% del total de proteínas de las células infectadas y del 0.3% del total de proteínas de las células no infectadas. Esto indica que existen diferencias en cuanto a las proteínas que se encuentran en cada población de membranas.

Es interesante que en la separación de proteínas por FFZE se observó que la población III contiene una mayor cantidad de proteínas (Figura II.2) y la población II la menor cantidad de proteína; sin embargo, al analizar el número de proteínas identificadas en cada población, se observó que la población II es muy diversa en número de proteínas, mientras que la población III tiene una diversidad menor de proteínas.

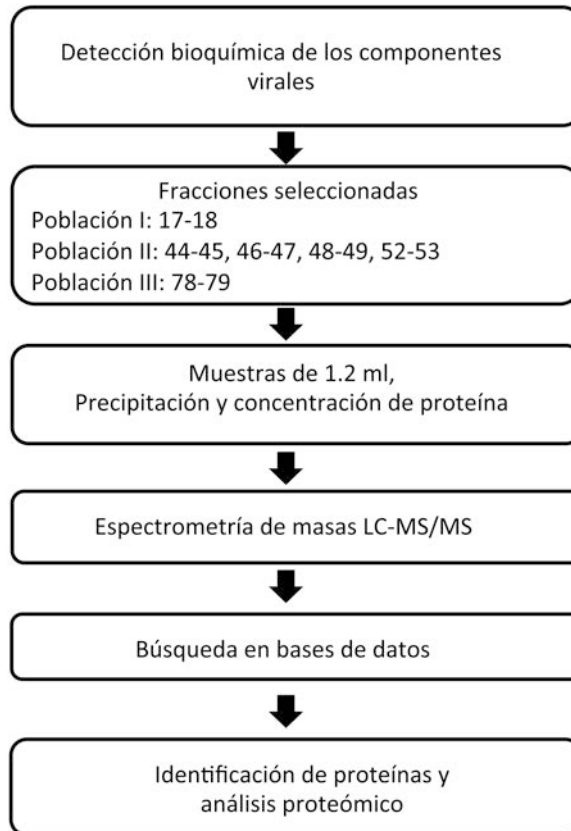


Figura II.8. Diagrama de flujo del análisis por espectrometría de masas.

▪

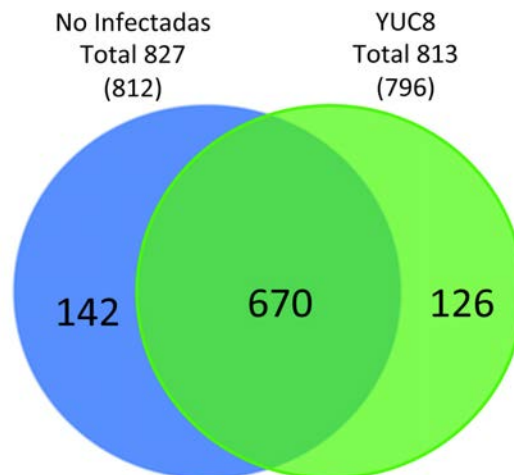
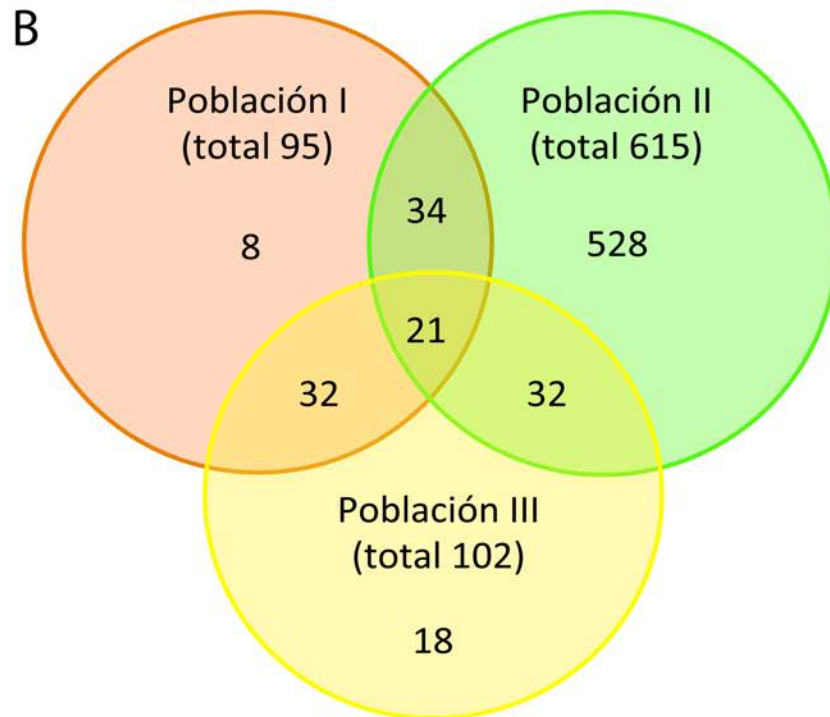
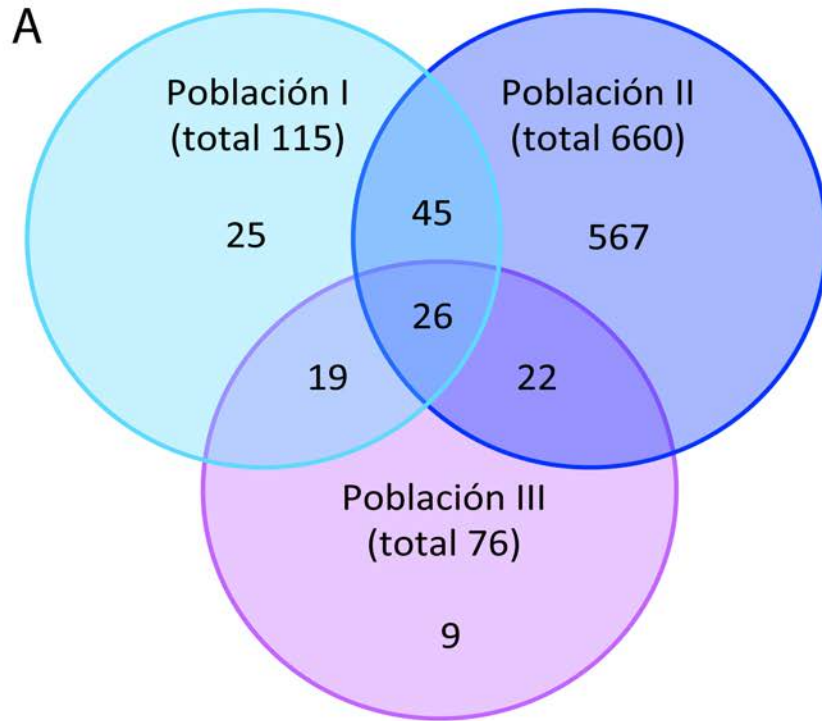


Figura II.9. Diagrama de Venn representando las proteínas totales. Número de proteínas identificadas en las tres poblaciones en total de células Caco-2 infectadas y no infectadas. Entre paréntesis se encuentra el número de proteínas sin contar las proteínas no identificadas (Uncharacterized) por las bases de datos utilizadas.

▪



---

**Figura II.10. Diagrama de Venn representando las proteínas identificadas por población de membranas.** Número de proteínas identificadas en cada una de las tres poblaciones de células Caco-2 no infectadas **(A)** e infectadas **(B)**.

### **12.3.3. Identificación de proteínas virales por espectrometría de masas (LC-MS/MS)**

La lista de iones fragmentados también fue ensamblada con la base de datos de virus y se encontró coincidencias con la proteína de la cápside y la proteína no estructural nsp1ab de astrovirus desde la fracción 44-45 a la 52-53 (Tabla S6). Como se observa en la tabla S6 las proteínas de astrovirus se identificaron con el mayor número de conteo de espectros totales. Se identificaron también algunas otras proteínas pertenecientes a otros virus, para las cuales se encontró un número bajo de espectros totales.

Con esta técnica se confirmó la presencia de las proteínas virales de manera exclusiva en fracciones de la población II previamente determinados por los ensayos de ELISA y Western blot.

### **12.4. ANÁLISIS DE REDES DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN LAS TRES POBLACIONES DE MEMBRANAS SEPARADAS DE CÉLULAS CACO-2 INFECTADAS CON ASTROVIRUS**

Una vez que se identificaron las proteínas presentes en las diferentes fracciones, se realizó el análisis de enriquecimiento funcional. Para ello se elaboraron redes de interacción de proteínas (para el total de proteínas y por poblaciones de membrana) mediante el uso de la base de datos y recursos bioinformáticos STRING (<http://string-db.org/>), la cual permite encontrar interacciones entre proteínas, basado en la minería de datos y en los diferentes tipos de evidencia. Las redes de interacción generadas fueron visualizadas en el programa CYTOSCAPE (<http://www.cytoscape.org/>). Además, para realizar una comparación funcional de las redes de interacción de proteínas, basado en las anotaciones GO ("gene

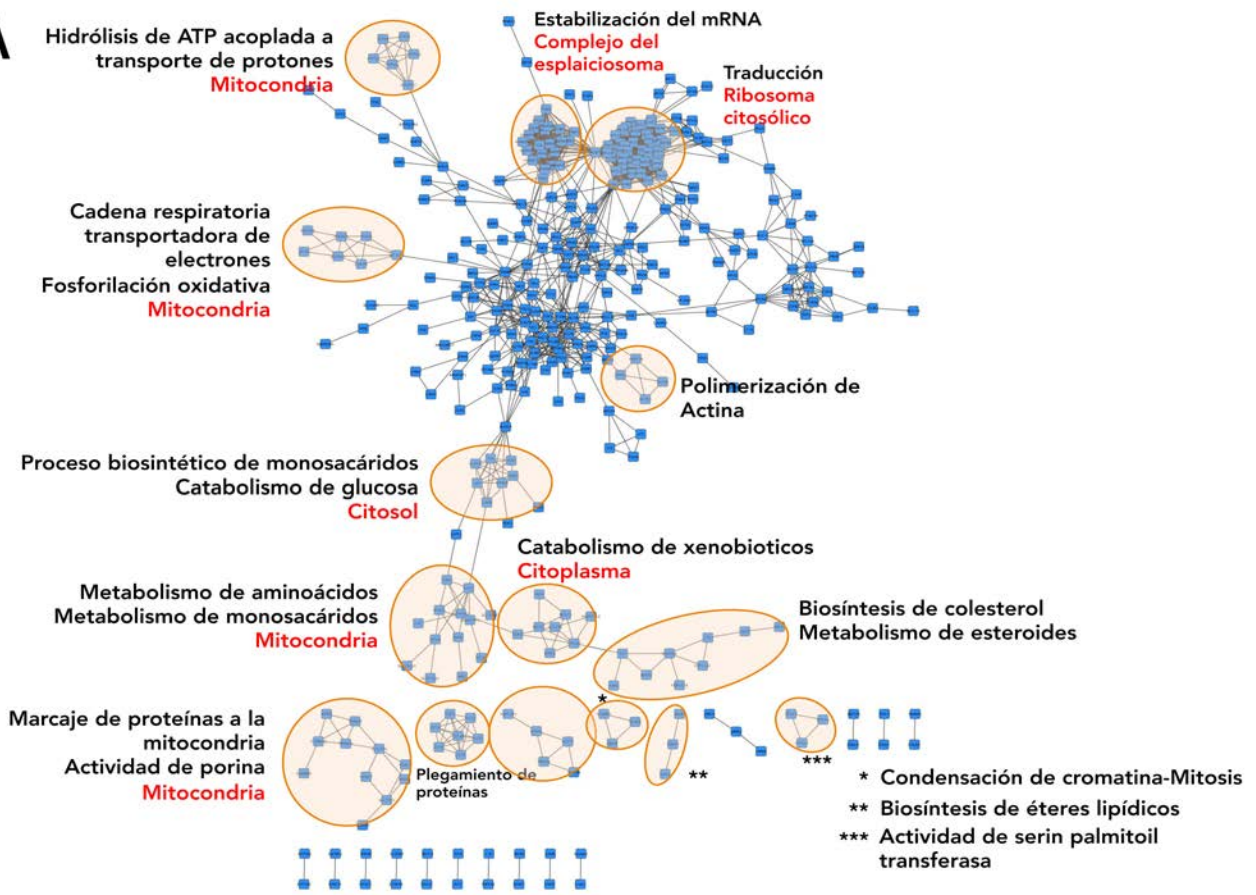
---

ontology" por su sigla en inglés) se utilizó el complemento para Cytoscape, ClueGO (Bindea *et al*, 2009).

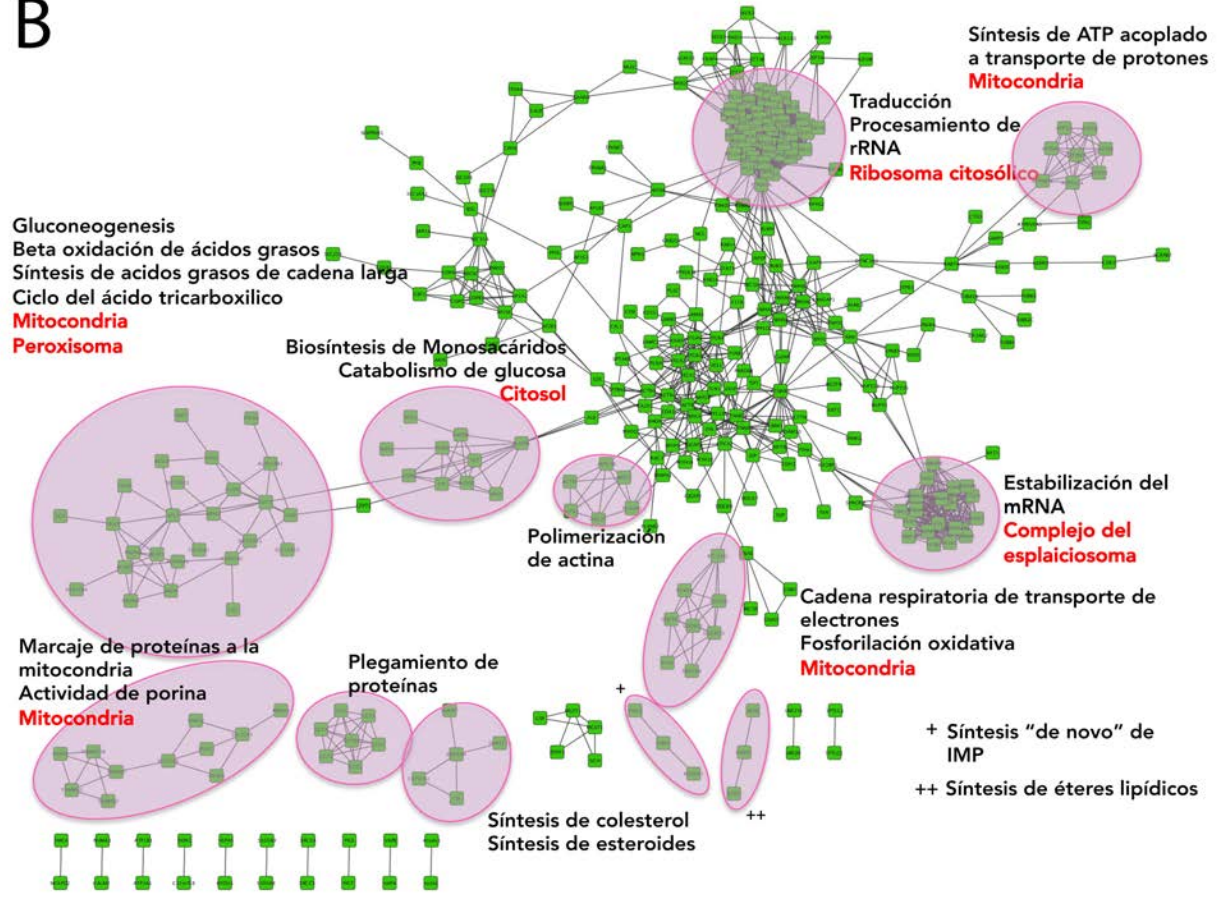
#### **12.4.1. Análisis funcional de las proteínas celulares totales**

Para determinar si existen diferencias entre las funciones de las proteínas presentes en las células infectadas respecto a las no infectadas en las diferentes fracciones, se determinaron las funciones de las proteínas totales de las tres poblaciones presentes en estas dos condiciones. Para esto a partir de las redes de interacción generadas, se realizó el enriquecimiento estadístico para términos GO (gene ontology). Las figuras II.11A y II.11B muestran las redes funcionales para el total de las fracciones analizadas en las células infectadas y no infectadas, respectivamente. La mayoría de las categorías GO se comparten entre las dos condiciones (Figura II.11C), sin embargo lo más importante son las funciones que encontramos diferentes: en las células no infectadas las categorías GO enriquecidas consistieron en las correspondientes al: metabolismo de aminoácidos, metabolismo de monosacáridos, metabolismo de xenobióticos, condensación de cromatina-mitosis y actividad serin-palmitoil transferasa, mientras que en las células infectadas las categorías GO diferentes fueron las correspondientes a la gluconeogénesis, beta-oxidación de ácidos grasos, síntesis de ácidos grasos de cadena larga y ciclo del ácido tricarbóxico (Figura II.11C), las cuales se encuentran enriquecidas y agrupadas en un "cluster", en contraste, sólo algunas de estas anotaciones GO se encontraron en las células no infectadas y distribuidas en diferentes "clusters" (Figura II.12C y II.12D).

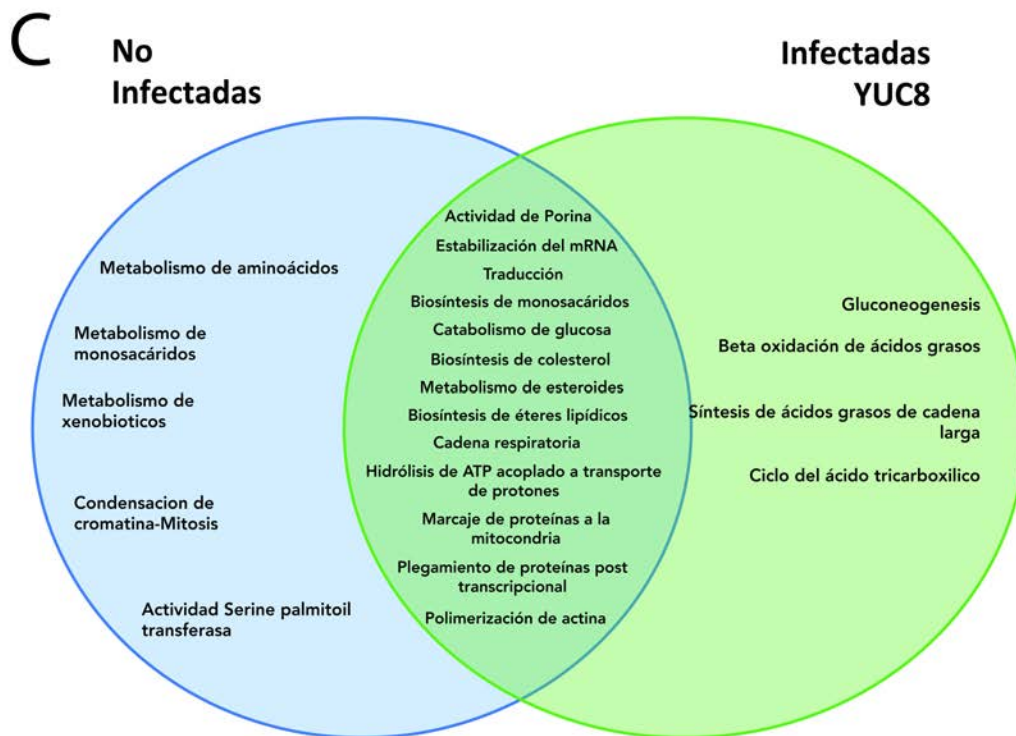
A



B







**Figura II.11. Redes de interacción proteína-proteína.** Se realizó el análisis *in silico* de las proteínas identificadas en las tres poblaciones de membranas de célula no infectadas **(A)** e infectadas **(B)** utilizando el programa STRING y visualizada por medio del software Cytoscape (versión 2.8.3). El análisis de las anotaciones GO, se hizo mediante la aplicación ClueGO para Cytoscape. El resultado del enriquecimiento de las anotaciones GO se resume en el diagrama de Venn **(C)**.



---

#### **12.4.2. Análisis funcional de las proteínas celulares en las tres poblaciones de membrana**

Con el objetivo de identificar las funciones de las proteínas identificadas en las tres diferentes poblaciones, se elaboraron redes de interacción de proteínas en cada una de ellas para las células infectadas y no infectadas. Luego de realizar el enriquecimiento de las funciones GO en cada población, se compararon las funciones de las proteínas entre las condiciones de células infectadas y células no infectadas. El resultado del análisis de las funciones de las proteínas en ambas condiciones fue su agrupación en funciones específicas en cada población (Figuras II.13A, II.13B y II.13C). Los análisis se enfocaron en la condición de células infectadas, por el posible re-arreglo de las membranas durante la infección con astrovirus. La agrupación de proteínas de las siguientes funciones para la población de membranas I fueron: glicolisis, activación de plaquetas, regulación positiva del transporte de proteínas, plegamiento de proteínas y unión a proteínas; en la población de membranas II: organización de los filamentos de actina, proceso biosintético de ATP, proceso catabólico de glucosa, N-glicosilación de proteínas, regulación de la traducción, transporte de protones, actividad acetil-CoA acetil transferasa, actividad ATPasa, transporte de hidrogeniones; por último en la población de membranas III: desarrollo de epidermis, unión a coenzimas, actividad carbón oxígeno liasa, unión a iones magnesio, unión a proteínas y unión a actina. Este análisis muestra que las proteínas separadas por FFZE en las tres poblaciones de membrana tienen diferentes funciones en la célula y que algunas de estas funciones son diferentes entre las células infectadas y no infectadas.

A

**POBLACIÓN I**

NO INFECTADAS

INFECTADAS YUC8

**115 proteínas**

- Organización de las uniones celulares
- Citocinesis
- Modificación peptidil-asparagin
- Regulación de la estabilidad proteica
- Proceso catabólico de ribonucleótidos
- Citoesqueleto de actina
- Fracción celular
- Membrana nuclear externa-membrana RE
- Región perinuclear
- Huso mitótico
- Actividad ATPasa
- Unión al ion calcio
- Unión a proteínas del citoesqueleto
- Unión a enzimas
- Unión a GDP

**95 proteínas**

- Glicólisis
- Activación de plaquetas
- Regulación positiva del transporte de proteínas
- Plegamiento de proteínas
- Córtex celular
- Unión a proteínas

- Desarrollo de epidermis
- Desmosoma
- Melanosoma
- Filamentos intermedios
- Actividad GTPasa
- Midbody

B

**POBLACIÓN III**

NO INFECTADAS

INFECTADAS YUC8

**76 proteínas**

- Organización de las uniones celulares
- Actividad de aldolasa fructosa bifosfato
- Actividad transferasa
- Unión a moléculas de adhesión
- Unión a DNA de cadena sencilla
- Actividad de factor de elongación de la traducción
- Unión a DNA telomérico

**102 proteínas**

- Organización de citoesqueleto de actina
- Proceso biosintético de monosacáridos
- Complejo de proteínas Arp 2/3
- Filamentos intermediarios
- Desmosoma

- Desarrollo de la epidermis
- Fibras contráctiles
- Unión a coenzimas
- Actividad carbon-oxígeno liasa
- Unión a magnesio
- Unión a proteínas
- Unión a actina



**Figura II.13.** Diagramas de Venn que muestran las anotaciones GO comunes entre las condiciones de células infectadas y no infectadas para la población I (A), población III (B) y población II (C).

---

### 12.4.3. Análisis de las proteínas en las fracciones donde se encontró a astrovirus

Los componentes virales se encontraron exclusivamente en la población de membranas II y éstos fueron más abundantes en las fracciones 48-49; por lo tanto se analizaron las proteínas celulares presentes en esta fracción tanto en las células infectadas como no infectadas.

De las 11 proteínas encontradas únicamente en la fracción 48-49 en células infectadas pero no en las no infectadas (Tabla II.1), se realizó una búsqueda en la literatura para determinar si algunas de estas proteínas habían sido reportadas como importantes en la replicación de otros virus de (+)RNA. Con base en esta información seleccionamos 7 de las 17 proteínas: ARF6, ARL1, CYP51A1, DDX23, ITPR3, CDS2 and EIF6 (Tabla II.2) con el fin de caracterizar su posible participación en la replicación de astrovirus. Adicionalmente se seleccionaron cuatro proteínas presentes en otras fracciones de la población de membranas II debido a su reconocida función en la replicación de virus (+)RNA: DHCR7, FASN, PI4KIIIA y PI4KIIIB (Tabla II.3).

**Tabla II.1. Lista de proteínas encontradas en la fracción 48-49 de las células infectadas.**

#	Proteínas	FFZE Fracción 48-49			
		Número de acceso (IPI)	Número de acceso (Uniprot)	No.de péptidos únicos	Porcentaje de cobertura
1	Eukaryotic translation initiation factor 6	IPI00010105	P56537	2	16%
2	ADP-ribosylation factor 6	IPI00215920	Q5U025	2	12%
3	Claudin-6	IPI00011084	P56747	2	12%
4	ADP-ribosylation factor-like protein 1	IPI00219518	P40616	2	19%
5	Sodium-dependent multivitamin transporter	IPI00031822	B4DDE5	3	6.10%
6	pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial isoform 2	IPI00376503	P32322	2	9.20%
7	Isoform 1 of Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	IPI00019599	Q13404	2	4.60%
8	Isoform 1 of Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	IPI00294178	P30154	2	10%
9	Isoform 1 of Phosphatidate cytidyltransferase 2	IPI00032150	B4E3K6	2	9.00%
10	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	IPI00291607	Q59ES2	2	1.00%
11	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	IPI00006725	A8KA56	2	3.40%

---

**Tabla II.2. Proteínas seleccionadas de la fracción 48-49 de las células infectadas.**

Proteínas seleccionadas de la fracción 48-49	PROTEÍNAS DE FUNCIÓN SIMILAR	VIRUS	FUNCIÓN	REFERENCIA
Eukaryotic translation initiation factor 6	eEF1 $\alpha$	TBSV,WNV	Reclutamiento de RNA y síntesis (-)	Li, <i>et al.</i> PLoS Pathog. 2010 Davis, <i>et al.</i> J. Virol. 2007
ADP-ribosylation factor 6	ARF1	PV	Necesario para la formación del complejo de replicación en membranas	Belov, <i>et al.</i> J. Virol. 2007 Belov, <i>et al.</i> J. Virol. 2005
ADP-ribosylation factor-like protein 1	ARL1		Regula la estructura y función del aparato de Golgi	Lu, <i>et al.</i> J. Cell Science. 2001
lanosterol 14-alpha demethylase isoform 1	SMO1, SMO2, ERG25	TBSV	Síntesis de esterol y formación del complejo de replicación	Sharma, <i>et al.</i> J. Virol. 2010
Isoform 1 of Phosphatidate cytidyltransferase 2		TBSV, NoV	Síntesis de cardiolipina, necesaria para la replicación viral	Sharma, <i>et al.</i> Virology. 2011 Sharma. Doctoral Dissertations <a href="http://uknowledge.uky.edu/gradschool_diss/845">http://uknowledge.uky.edu/gradschool_diss/845</a>
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	DDX1	IBV	DDX1 contribuye a la replicación eficiente de coronavirus	Xu, <i>et al.</i> J. Virol. 2010
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	IPR3	HIV-1	HIV-1 tráfico durante el ensamble de Gag	Ehrlich, <i>et al.</i> J. Virol. 2010

Tomato bushy stunt virus (TBSV), West Nile Virus (WNV), Polio virus (PV), Coronavirus infectious bronchitis virus (IBV), Nodamura virus (NoV), Human Immunodeficiency virus type (HIV-1)

**Tabla II.3. Total de proteínas seleccionadas para evaluar su posible función en la replicación de astrovirus.**

	Proteína	Abreviatura
Fracción 48-49	Eukaryotic translation initiation factor 6	EIF6
	ADP-ribosylation factor 6	ARF6
	ADP-ribosylation factor-like protein 1	ARL1
	lanosterol 14-alpha demethylase isoform 1	CYP51A1
	Isoform 1 of Phosphatidate cytidyltransferas	CDS2
	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	DDX23
	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	ITPR3
Otra fracción	7-dehydrocholesterol reductase	DHCR7
	Fatty acid synthase	FASN
	phosphatidylinositol 4-kinase alpha	PI4KIII A
	phosphatidylinositol 4-kinase beta	PI4KIII B

---

## 12.5. EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN 48-49 POR INTERFERENCIA DEL RNA SOBRE LA REPLICACIÓN DE ASTROVIRUS

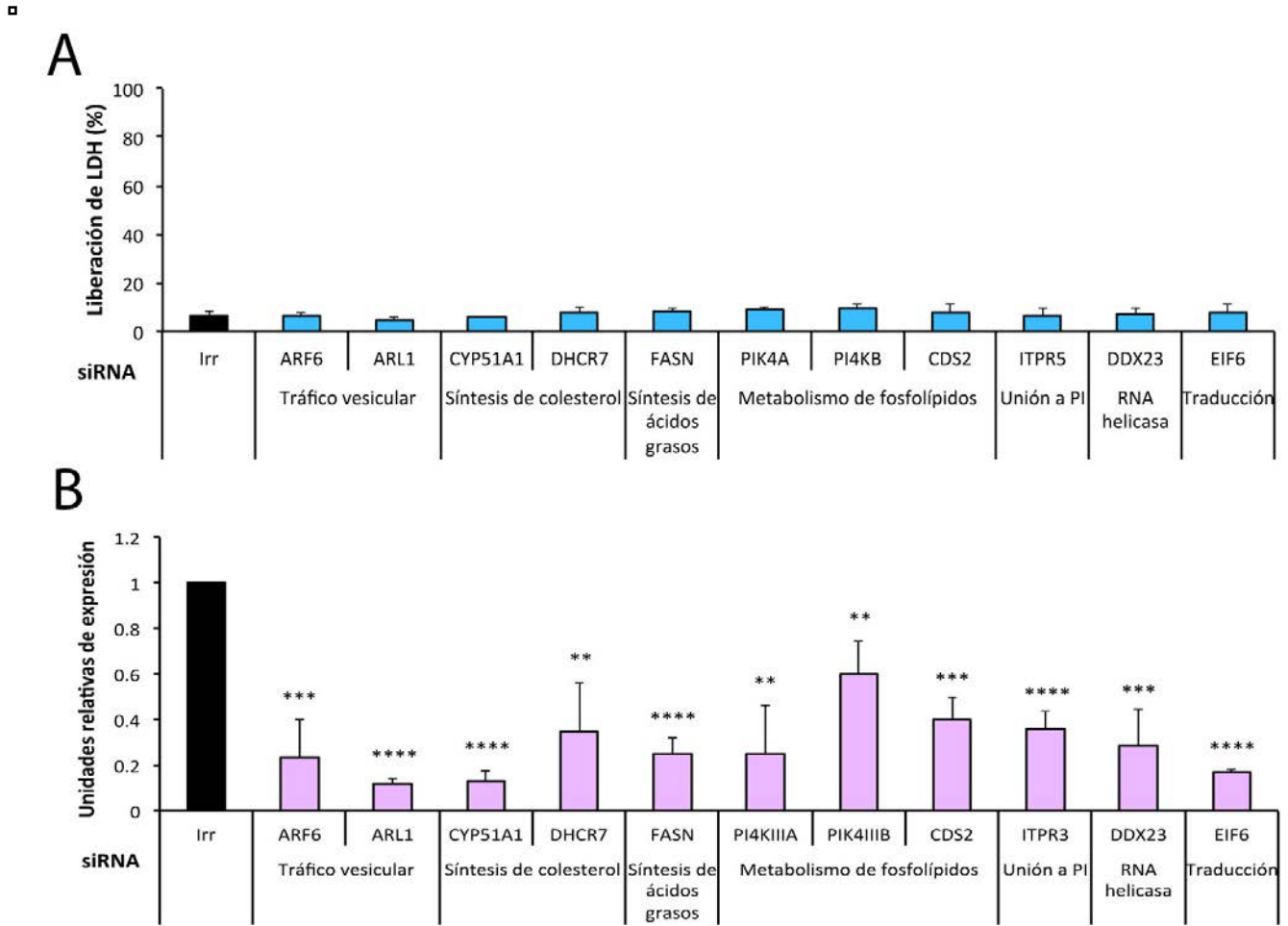
Con el fin de determinar la posible participación de las 11 proteínas seleccionadas (Tabla II.3) en la replicación de astrovirus, se utilizó la estrategia de silenciar la expresión de los genes codificantes para estas proteínas mediante RNA de interferencia (siRNA). Primero se comprobó tanto la viabilidad de las células 72 horas post transfección (hpt) del siRNA (Figura II.14A), mediante la cuantificación de la deshidrogenasa láctica liberada (LDH), así como también, la eficiencia de silenciamiento de los siRNA sobre la expresión del gen (correspondiente), por medio de cuantificación del RNA mensajero mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR) (Figura II.14B). Para determinar el efecto del silenciamiento de los genes celulares seleccionados sobre la producción de partículas virales (rendimiento viral), las células Caco-2 fueron transfectadas con los correspondientes siRNA y 72 hpt se infectaron con astrovirus Yuc8. Finalmente, 48 hpi las células se sometieron a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento con el fin de liberar las partículas virales, las cuales se titularon sobre una monocapa de células Caco-2. Al silenciar los genes *CYP51A1*, *DHCR7*, *FASN*, *PI4KIII-B*, *ITPR3* Y *DDX23* se observó una disminución significativa en la progenie viral (entre 40 y 50%) respecto al interferente irrelevante (Figura II.15).

La disminución de la progenie viral que observamos puede deberse a que las proteínas codificadas por los genes silenciados pueden tener una función en la replicación del RNA, o en la síntesis de proteínas o en el ensamble de las partículas virales.

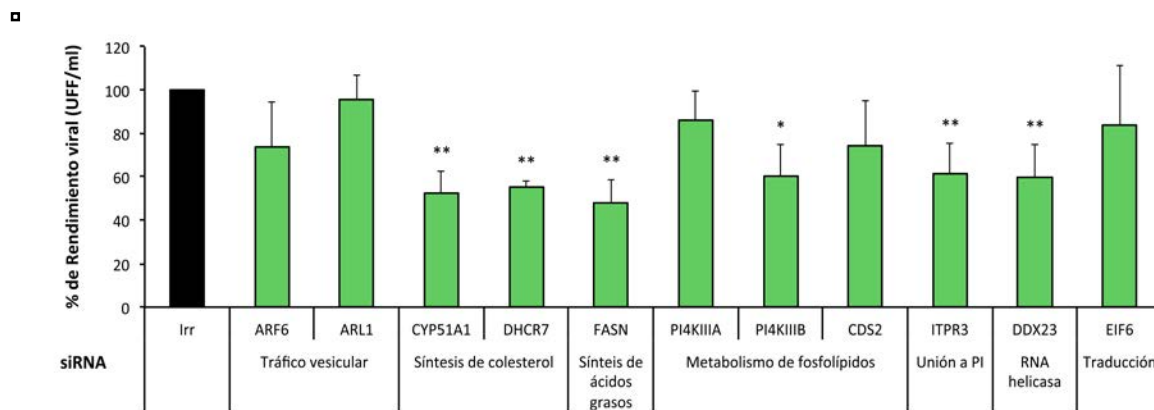
Para determinar el efecto del silenciamiento de estos genes sobre la síntesis de RNA, cuantificamos el RNAg y RNAag por PCR cuantitativo (qRT-PCR), a partir de las células infectadas y previamente transfectadas con los respectivos siRNA. Para esto células Caco-2 transfectadas con los siRNAs *DHCR7*, *FASN*, *CYP51A1*, *ITPR3*, *PI4KIII-B* y *DDX23* se infectaron con astrovirus Yuc8, a las 12 hpi se extrajo el RNA y se determinó la abundancia del RNAg y RNAag como se describe e Materiales y Métodos. El silenciamiento de la expresión de estos genes disminuyó la síntesis de RNAag entre el 75% y 90% (*FASN*, *ITPR3*



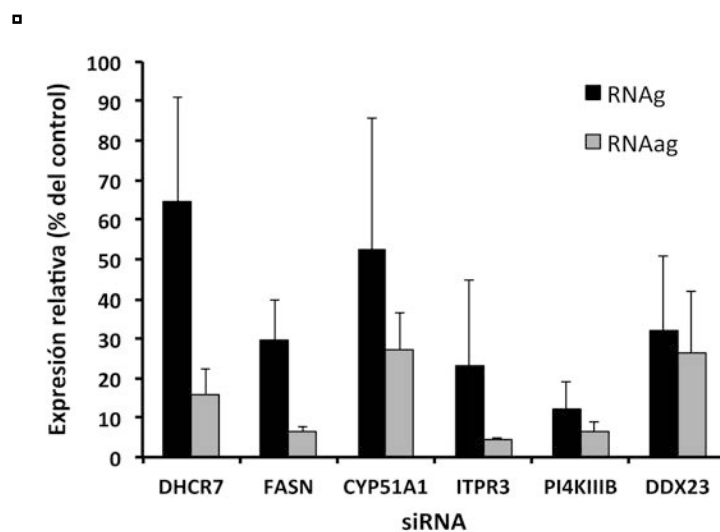
y PI4KIII-B) (Figura II.16), mientras que la reducción del RNAg fue menos pronunciada, del 35% para DHCR7 y CYP51A1 a 60% para FASN, ITPR3 y DDX23, y del 80% para PI4KIII-B.



**Figura II.14. Viabilidad de las células transfectadas y eficiencia del silenciamiento.** Las células Caco-2 fueron transfectadas con el siRNA indicado o con el siRNA irrelevante. Setenta y dos horas post transfección, se midió la liberación de LDH (LDH total, liberada e intracelular) (A) y se determinó la eficiencia del silenciamiento por PCR cuantitativo en tiempo real (B). Los datos muestran la desviación estándar de tres experimentos independientes. . \*\*\*\*P < 0.0001; \*\*\*P < 0.001; \*\*P < 0.01.



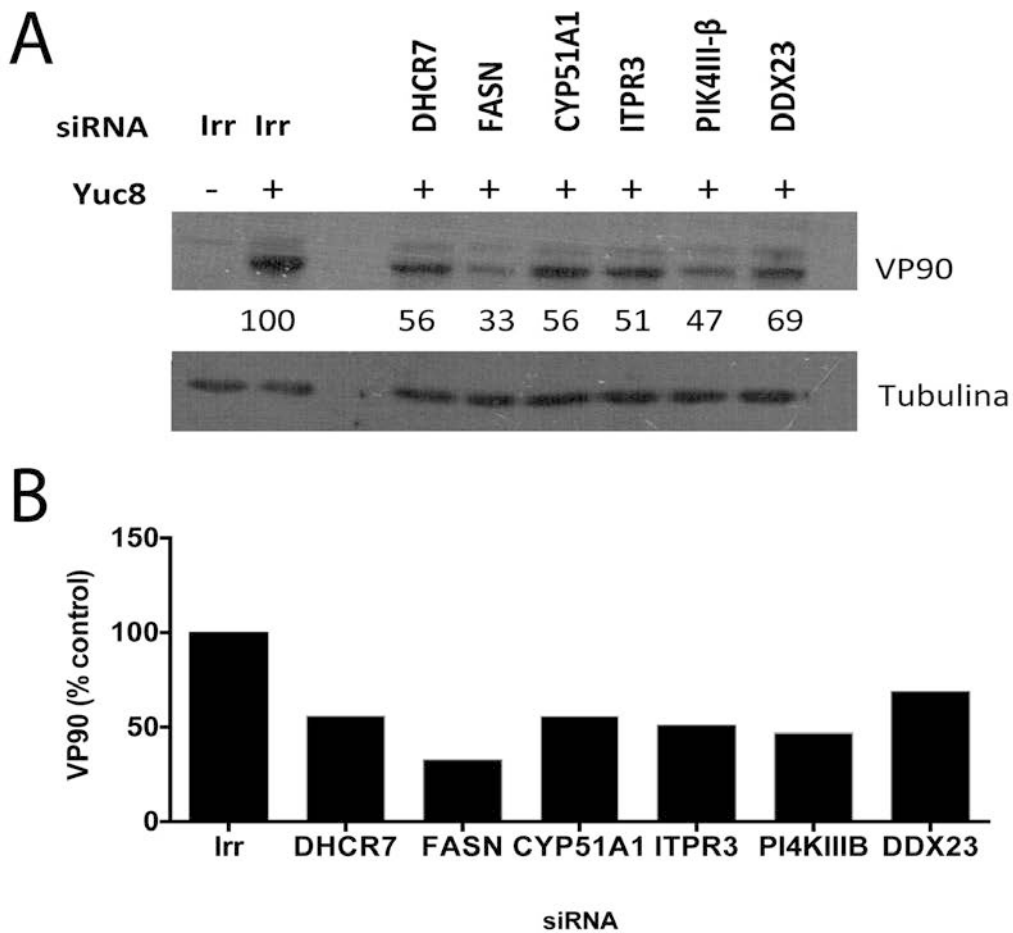
**Figura II.15. Efecto del silenciamiento de los genes celulares seleccionados sobre la infectividad y el rendimiento viral.** Células Caco-2 fueron transfectadas con los siRNA indicados, 72 hpt se infectaron con astrovirus Yuc8 (MOI 5), 18 hpi las células fueron congeladas y descongeladas tres veces y se procedió como se describe en Materiales y Métodos para cuantificar la producción de partículas virales como UFF/ml. Los datos muestran la desviación estándar entre tres experimentos independientes. \*\*\*\*P < 0.0001; \*\*\*P < 0.001; \*\*P < 0.01.



**Figura II.16. Cuantificación del RNAg y RNAag en células silenciadas.** Las células Caco-2 fueron transfectadas con el siRNA indicado, 72 hpt se infectaron con astrovirus Yuc8 y el RNA se extrajo a las 12 hpi. La expresión del RNA viral fue determinada por PCR en tiempo real (qRT-PCR) utilizando un oligonucleótido antisentido para el RNAg (barras negras) o uno sentido para el RNAag (barras grises). Los resultados representan el % de la expresión relativa comparado con células transfectadas con el control [siRNA irrelevante (Dharmacon Non-targeting)]. Los datos muestran la desviación estándar de tres experimentos independientes.

La síntesis de la proteína estructural VP90 en células transfectadas con los siRNA e infectadas con astrovirus Yuc8 se evaluó por Western blot. A las 12 hpi, la cantidad de VP90 se encontró entre el 33 y 69% en comparación con las células transfectadas con el siRNA irrelevante. El mayor efecto sobre la síntesis de VP90 se encontró al silenciar la expresión de los genes *FASN*, *ITPR3* y *PI4KIII-B* (Figure II.17). En general se encontró una concordancia entre los niveles de RNAg y RNAag y la abundancia de VP90, es decir, aquellos siRNA que produjeron la disminución mayor de RNA también mostraron tener un mayor efecto sobre la síntesis de la proteína viral.

□



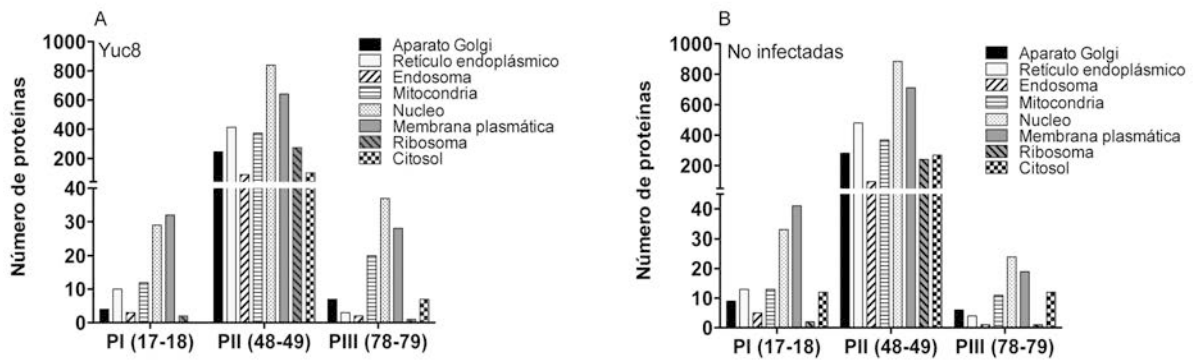
---

**Figura II.17. Efectos de los siRNA sobre la síntesis de VP90.** Las células Caco-2 fueron transfectadas con los siRNA indicados, incluyendo el control siRNA irrelevante (Irr), a las 72 hpt las células fueron infectadas con astrovirus Yuc8 y 12 hpi la monocapa de células fue solubilizada en amortiguador Laemmli 1x. **(A)** Las proteínas fueron analizadas por Western blotting para la detección de la proteína estructural de astrovirus usando en anticuerpo anti-Yuc. La proteína tubulina fue usada como marcador de carga. Los números muestran la señal del Western blot cuantificada, normalizada respecto al marcador de carga y al control Irr, los datos se grafican en **(B)**. La figura se escogió de dos experimentos independientes.

#### **12.6. Análisis de los marcadores de organelo en las poblaciones de membranas separadas de células Caco-2 infectadas con astrovirus**

Las proteínas de las tres poblaciones se analizaron con el fin de determinar el enriquecimiento de proteínas derivadas de uno o varios organelos en las diferentes poblaciones, lo que podría dar información acerca del origen de las membranas a las que podría asociarse astrovirus durante su replicación. Primero se buscaron las proteínas marcadoras de organelo "*bonafide*" y como se observa en la Tabla II.4, los marcadores de organelos específicos reportados se encuentran principalmente en la población II.

El análisis de las proteínas totales dio lugar a la identificación de proteínas asociadas a membranas de diferentes organelos en las tres poblaciones (Figura II.18), aunque hubo un enriquecimiento de proteínas de membrana derivadas de Golgi, retículo endoplásmico, mitocondria, núcleo y membrana plasmática en la fracción 48-49 (Figura II.18).



**Figura II.18.** Anotaciones GO (gene Ontology) para la categoría compartimento celular de las proteínas identificadas de las fracciones FFZE de células infectadas **(A)** o no infectadas **(B)**. La clasificación de las proteínas de las fracciones 17-18 (Población I), 48-49 (Población II) y 78-79 (Población III) se indican como PI (17-18), PII (48-49) Y PIII (78-79). El análisis se desarrolló usando el programa SCAFFOLD 4 como se describe en Materiales y Métodos.

**Tabla II.4. Marcadores de organelos encontrados en las proteínas de las tres poblaciones de membranas en células Caco-2 infectadas con astrovirus Yuc8.**

Marcador de organelo	Proteínas totales Yuc8 (813)	Fracción					
		17-18	44-45	46-47	48-49	52-53	78-79
Proteasoma	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2		X	X			
Ribosoma	40S ribosomal protein S6		X	X	X	X	
	60S ribosomal protein L26		X	X		X	
	60S ribosomal protein L7a		X	X	X	X	
Aparato de Golgi	Alpha-mannosidase 2		X	X	X		
	Isoform Long of Beta-1,4-galactosyltransferase 1		X	X	X	X	
	Isoform TGN51 of Trans-Golgi network integral membrane protein 2		X	X	X	X	
Retículo endoplásmico	78 kDa glucose-regulated protein	X	X	X	X	X	
	Calreticulin		X	X	X	X	
	Protein disulfide-isomerase	X	X	X	X	X	
	Tubulin alpha-1B chain	X	X	X	X	X	
Peroxisoma	Catalase			X			X
Exosomas	CD81 antigen				X	X	
	CD9 antigen					X	
Cromatina	Histone H3.1		X	X	X	X	
	Histone H4		X	X	X	X	
Mitocondria	Isoform 1 of Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial		X	X	X		X
	Prohibitin		X	X	X	X	
Endosomas	Isoform 1 of Clathrin heavy chain 1		X	X	X	X	
	Ras-related protein Rab-7a		X	X	X	X	
	Isoform 2 of AP-2 complex subunit alpha-2		X	X	X	X	
Nucleolo	Isoform 1 of Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2		X	X	X	X	
Membrana nuclear	Isoform A of Prelamin-A/C		X	X		X	
	Laminin subunit beta-1		X	X	X	X	
	Nuclear pore complex protein Nup93		X	X	X		
Autofagosomas y lisosomas	Isoform LAMP-2A of Lysosome-associated membrane glycoprotein 2		X	X	X	X	
	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1		X	X	X	X	

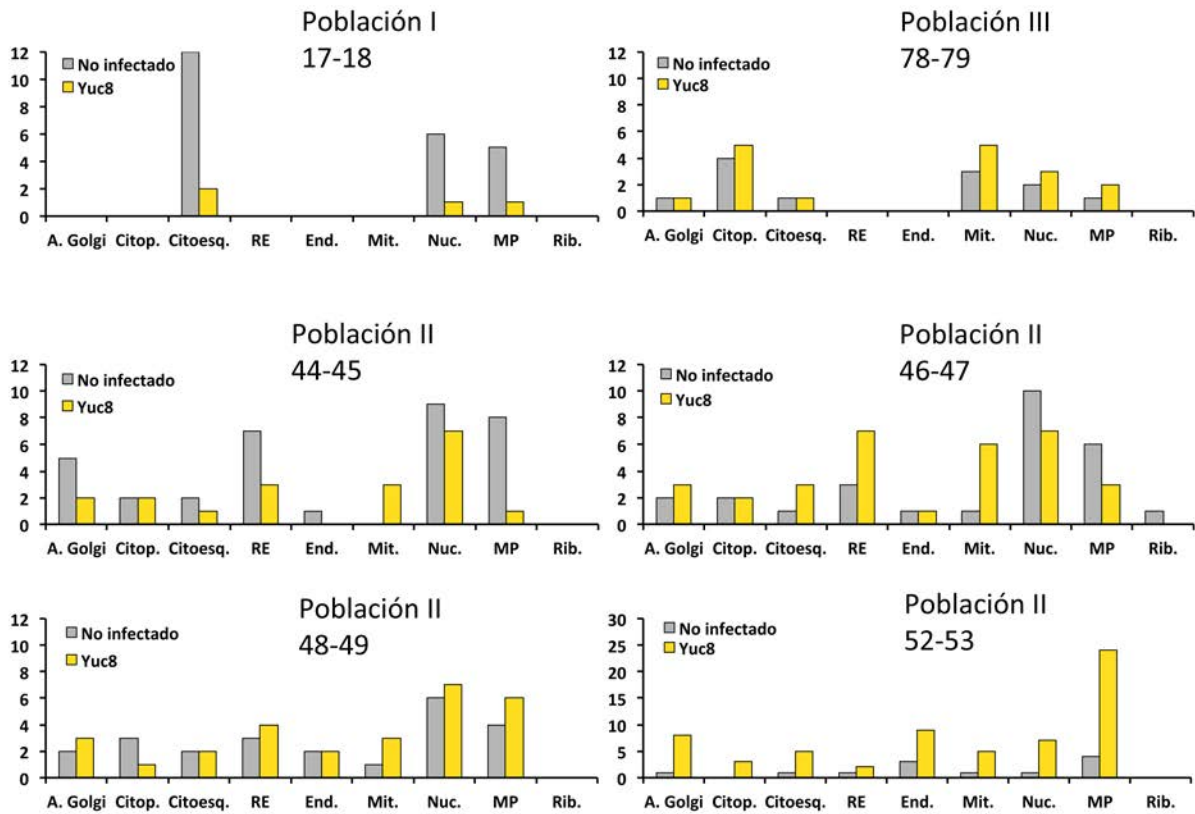
---

Por otro lado, el análisis de las proteínas únicas de las fracciones de las tres poblaciones en células infectadas mostró diferencias en el número de proteínas por organelo (Figura II.19). En la fracción 17-18 no se encontraron proteínas anotadas en las categorías de aparato de Golgi, citosol, retículo endoplásmico, endosomas ni mitocondrias, mientras que para la fracción 78-79 no se encontraron proteínas en retículo endoplásmico ni endosomas. En las cuatro fracciones de la población II se observa que se encuentran más proteínas de núcleo para la fracción 44-45, núcleo y retículo endoplásmico para la fracción 46-47, núcleo y membrana plasmática para la fracción 48-49 y membrana plasmática para la fracción 52-53.

Adicionalmente se encontraron diferencias entre el número de proteínas por organelo entre las condiciones no infectadas e infectadas (Figura II.19).

Estas observaciones, sin embargo, no permiten determinar de que organelo(s) se derivan las membranas que astrovirus podría utilizar durante su replicación.

□



**Figura II.19. Número de proteínas únicas anotadas en las categorías GO de compartimento celular.** Anotaciones GO (Gene Ontology) para las categorías: Aparato de Golgi (A. Golgi), Citoplasma (Citop.), Citoesqueleto (Citoesq.), Retículo endoplásmico (RE), Endosoma (End.), Mitochondria (Mit.), Núcleo (Nuc.), Membrana plasmática (MP), Ribosoma (Rib.) en células no infectadas e infectadas. El análisis se desarrolló usando el programa SCAFFOLD 4 como se describe en Materiales y Métodos.



---

### 13. DISCUSIÓN

Los virus de RNA(+) aprovechan una variedad de factores celulares y membranas que explotan con el fin de generar nuevas estructuras membranosas donde se lleva a cabo la replicación del genoma y el ensamble de las partículas virales.

Mediante el uso de gradientes de densidad de iodixanol, nuestro grupo reportó previamente que las proteínas estructurales y no estructurales de astrovirus Yuc8 se asocian a membranas celulares (Méndez *et al.*, 2007). Esta técnica ha sido utilizado con éxito para separar proteínas de organelos de las proteínas citosólicas, ya que las proteínas asociadas a membranas flotan después de ultracentrifugación en este tipo de gradientes (Xia *et al.*, 1998). En el presente trabajo se quiso mejorar la separación de diferentes clases de membranas en las células infectadas por astrovirus. Para lograr este objetivo se utilizó la electroforesis zonal en flujo libre (FFZE), la cual se emplea para fraccionar y enriquecer muestras que contengan moléculas o partículas cargadas (organelos, proteínas, complejos de proteínas, proteínas asociadas a membranas, péptidos etc.) de acuerdo a su movilidad electroforética (Barkla *et al.*, 2007; Canut *et al.*, 1999). Esta separación se lleva a cabo en una capa acuosa delgada, en ausencia de una fase estacionaria o matriz como gel de acrilamida o agarosa, tanto en condiciones nativas como denaturantes (<http://www.bd.com/proteomics/products/FFE/faqs.asp>).

En general para los virus de RNA(+) estudiados se ha descrito que son las proteínas no estructurales las que participan en la inducción de los rearrreglos de membrana (Paul e *et al.*, 2012). Como parte del ciclo de replicación de astrovirus, las poliproteínas no estructurales se generan a partir del procesamiento proteolítico de una poliproteína precursora, mediado por la proteasa viral y por, al menos, una proteasa celular (Méndez *et al.*, 2013), y es posible que alguna(s) de las proteínas no estructurales pudiera(n) estar involucrada(s) en la inducción de los rearrreglos de membrana. A diferencia de la proteína nsp1b, que contiene el dominio RNA polimerasa, la proteína nsp1a tiene en su secuencia cinco dominios transmembranales (Méndez *et al.*, 2013b), lo que sugiere su asociación a membranas; adicionalmente, se ha reportado que el extremo carboxilo terminal de la proteína nsp1a (nsp1a/4) de astrovirus HAstV-4 tiene una secuencia de retención en el

---

retículo endoplásmico y por inmunofluorescencia se observó la acumulación de esta proteína en la región perinuclear (Guix *et al.*, 2004). Sin embargo, no se conoce si la poliproteína completa o alguno de los productos de procesamiento de la misma participan en los rearrreglos de membrana.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la replicación del RNA y el ensamble de las partículas virales infecciosas podrían llevarse a cabo en asociación con las membranas presentes en la población II de membranas. Para algunos virus de RNA(+) se ha descrito que la replicación del RNA y el ensamble de las partículas virales se lleva a cabo en diferentes compartimentos membranosos y, dependiendo del virus, la replicación puede ocurrir en membranas alteradas derivadas del retículo endoplásmico (El-Hage *et al.*, 2003), el aparato de Golgi (Roulin *et al.*, 2014), la mitocondria (Miller *et al.*, 2001), las gotas lipídicas (Gaunt *et al.*, 2013) o los lisosomas (Berger *et al.*, 2009). Por ejemplo, para HCV se ha descrito que la localización del complejo de replicación del RNA ocurre principalmente en membranas derivadas del retículo endoplásmico (El-Hage *et al.*, 2003), mientras que la formación de las partículas virales parece llevarse a cabo en membranas asociadas a gotas lipídicas (del inglés: lipid droplets) (Miyanari *et al.*, 2007). Por otro lado, para PV se ha descrito que la replicación ocurre en membranas modificadas provenientes de diferentes organelos (Schlegel *et al.*, 1996). En el caso de astrovirus, en este trabajo se encontró que la población de membranas II se encuentra enriquecida en membranas de diferentes organelos, incluyendo aparato de Golgi, retículo endoplásmico, mitocondria, membrana plasmática y núcleo, lo que sugiere un arreglo similar a lo observado en PV. Adicionalmente, es interesante el hallazgo de un gran número de proteínas nucleares en la población II, lo que puede reflejar la continuidad de la envoltura nuclear con la membrana del retículo endoplásmico. Por otro lado, las proteínas nucleares en realidad no son exclusivas del núcleo y transitan entre el citoplasma y el núcleo; por ejemplo, recientemente Espinosa-Hernández *et al.*, demostraron que la proteína PTB (por su nombre en inglés Polypyrimidine Tract Binding Protein), también llamada hnRNP1, se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células no infectadas, mientras que en células infectadas con astrovirus Yuc8 se concentra en la región perinuclear

---

(Espinosa-Hernández *et al.*, 2014). Además, en ese trabajo se demostró que la unión de PTB/hnRNP1 al extremo 3' de astrovirus Yuc8 se lleva a cabo en el citoplasma y se requiere para la replicación viral. En el caso de astrovirus se requieren experimentos adicionales para definir si la replicación del RNA y el ensamble de las partículas virales ocurren en el mismo tipo de estructuras membranosas o si los complejos de replicación del RNA del virus se encuentran unidos a un solo tipo de membranas o a membranas modificadas provenientes de diferentes organelos.

Los análisis de microscopía electrónica y de tomografía han generado información importante acerca de la estructura 3-D de las fábricas de replicación de los virus de RNA(+) (Paul *et al.*, 2013). La arquitectura de los rearrreglos de membrana en las células infectadas con astrovirus no se conoce, sin embargo, los análisis ultraestructurales por microscopía electrónica e inmunomicroscopía electrónica en células Caco-2 infectadas con astrovirus Yuc8 han mostrado grandes grupos de partículas virales alrededor de vesículas y la presencia en ellas de la RNA polimerasa. Las vesículas presentes en células infectadas no se observan en células no infectadas (Méndez *et al.*, 2007). Estas vesículas probablemente corresponden a las vesículas de doble membrana observadas en células Caco-2 infectadas con HAstV-4, alrededor de las cuales también se reportó la presencia de agregados virales (Guix *et al.*, 2004). Adicionalmente, en el trabajo de Méndez *et al.*, (2007) se observaron estructuras similares a cisternas alrededor de un centro oscuro o electrodensito en células Caco-2 infectadas con Yuc8, las cuales son similares a las encontradas en células HeLa infectadas con poliovirus (Schlegel *et al.*, 1996). En ambos casos las partículas virales se observaron alrededor de estas estructuras denominadas de "herradura" (Schlegel *et al.*, 1996). La presencia de proteínas estructurales en las membranas de vesículas rodeadas por partículas virales también ha sido descrita para HAstV-4 y HAstV-8. Adicionalmente, las vesículas descritas anteriormente en las células infectadas por astrovirus (Méndez *et al.*, 2007, Guix *et al.*, 2004) parecieran tener un aspecto similar a las gotas lipídicas observadas en las células infectadas con HCV (Miyanari *et al.*, 2007). Aunque se requieren más estudios para determinar la participación de las gotas lipídicas en los rearrreglos de membranas inducidos por astrovirus, el hecho de que estos organelos sean considerados

---

de origen del retículo endoplásmico (Thiam *et al.*, 2013) sugiere su posible participación en las nuevas estructuras membranosas generadas durante la replicación del virus.

El hecho de que en las fracciones 48-49 de la población II de membranas de las células infectadas estén enriquecidas en las proteínas y RNA virales, sugiere que estas fracciones pueden ser importantes en la replicación viral. Para investigar esto a mayor profundidad, seleccionamos 11 proteínas de estas fracciones que estuvieron involucradas en los procesos biosintéticos enriquecidos en las membranas de células infectadas (Figuras 11C y 13) o que fueron reportados previamente como factores requeridos para la replicación de otros virus de RNA(+) (Berger *et al.*, 2009, Ehrlich *et al.*, 2010, Lu *et al.*, 2001, Sasaki *et al.*, 2012, Sharma *et al.*, 2010, Sharma *et al.*, 2011). El silenciamiento de los genes que codifican para estas 11 proteínas mostró que la disminución de la expresión de 6 de estos genes redujo el rendimiento viral. Estos hallazgos revelaron que enzimas de la síntesis de colesterol DHCR7 y CYP51A1, de la síntesis de ácidos grasos FASN, la enzima fosfatidil inositol quinasa PI4KIIIB y el receptor del inositol trifosfato ITPR3, así como la RNA helicasa DDX23 se requieren para la replicación eficiente de astrovirus.

El aparente requerimiento de la síntesis de colesterol y de ácidos grasos para la replicación de astrovirus concuerda con el hecho de que otros virus de RNA(+) también dependen de la síntesis de estos compuestos para inducir cambios ultraestructurales extensos en las células infectadas para proveer las plataformas necesarias para las fábricas de replicación viral (Perera *et al.*, 2012). Por ejemplo, la inducción por HCV induce cambios significativos en la expresión de genes involucrados en la biosíntesis, degradación y transporte de lípidos intracelulares (Blackham *et al.*, 2010), y también altera el metabolismo de lípidos (Liefhebber *et al.*, 2014) tanto a nivel transcripcional (Blackham *et al.*, 2010) como post transcripcional (Diamond *et al.*, 2010) para facilitar la oxidación de lípidos y la generación de energía. En el caso del DENV se identificaron tres vías celulares requeridas para su replicación: autofagia, polimerización de actina y biosíntesis de ácidos grasos (Heaton *et al.*, 2010a), además, en este reporte encontraron que la enzima sintasa de los ácidos grasos (FASN) se relocaliza a los sitios de replicación del virus, proceso que parece ser dirigido por la proteína no estructural NS3 (Heaton *et al.*, 2010a). Además se ha

---

reportado el incremento de ácidos grasos vía lipogénesis en células de mosquito infectadas con DENV (Perera *et al.*, 2012). Al parecer los ácidos grasos pueden aumentar en las células infectadas por DENV por síntesis (mediante la enzima FASN) o por una liberación de ácidos grasos provenientes del catabolismo de fosfolípidos y triglicéridos (Perera *et al.*, 2012), los cuales serán sustratos de la B-oxidación mitocondrial así como intermediarios en la síntesis de nuevos lípidos (Blackham *et al.*, 2010). En concordancia con estos reportes, en los resultados del presente trabajo se encontró un enriquecimiento de las proteínas involucradas en la B-oxidación de ácidos grasos en el análisis de redes de interacción que forman las proteínas en las células infectadas (Figura II.12). Se encontraron enzimas tanto de la síntesis de ácidos grasos como de la B-oxidación, por lo tanto sería interesante evaluar el cambio del metabolismo de los lípidos en las células infectadas con astrovirus.

Se ha reportado que la replicación del virus DENV también depende de la producción de colesterol endógeno, ya que las proteínas no estructurales del virus se asocian con las balsas lipídicas, y la disminución del colesterol reduce la infección por DENV, así como también por el virus de la encefalitis japonesa (Lee *et al.*, 2008, Rothwell *et al.*, 2009). También ha sido reportado que el virus WNV modula la homeostasis del colesterol de la célula hospedera aumentando la biosíntesis y redistribuyendo el colesterol a las membranas donde el virus se replica (Mackenzie *et al.*, 2007). Además, la infección por HCV incrementa la abundancia y actividad de la enzima FASN con un incremento en la producción de ácidos grasos y lípidos neutros (Nasheri *et al.*, 2013), y el DENV induce la relocalización de FASN, reclutándola a los sitios de replicación viral (Heaton *et al.*, 2010a) en un proceso mediado por Rab18 (Tang *et al.*, 2014, Rasineni *et al.*, 2014).

Un aspecto adicional del metabolismo de lípidos que es aprovechado por diversos flavivirus durante su replicación, está relacionado con las gotas lipídicas (Herker *et al.*, 2012). La asociación de proteínas de HCV y las fábricas virales con gotas lipídicas es necesaria para la replicación y el ensamblaje de las partículas virales (Miyinari *et al.*, 2007, Filipe *et al.*, 2015, Hope *et al.*, 2002) y la replicación de DENV también depende de estos organelos (Samsa *et al.*, 2009). En el caso de rotavirus, un virus de dsRNA, se ha mostrado

---

que las gotas lipídicas son reclutadas a los complejos de replicación, en los viroplasmos (Cheung *et al.*, 2010). También se ha descrito que los lípidos neutros almacenados en estos organelos son usados para generar energía requerida para la replicación de HCV y probablemente rotavirus (Liefhebber *et al.*, 2014, Crawford *et al.*, 2013). La participación de las vías de biosíntesis de ácidos grasos encontrado en este trabajo sugiere que las gotas lipídicas pueden también trabajar como fuente de energía para la replicación de astrovirus.

De las proteínas únicas identificadas en la fracción 48-49 escogimos la helicasa de RNA ATP-dependiente DDX23 debido al hecho de que, en contraste con otros virus de RNA(+), no se ha identificado una RNA helicasa de origen viral (Méndez *et al.*, 2013b). Dado que la longitud del genoma de astrovirus es de más de 6000 nt es de esperar que la traducción y replicación del genoma viral requiera una helicasa, la cual podría entonces ser de origen celular (Jiang *et al.*, 1993). Nuestros resultados mostraron que el silenciamiento de DDX23 causó una disminución en la síntesis de RNA y de la proteína estructural VP90, así como también en la producción de partículas virales, lo que indica que posiblemente tiene una función relevante durante la replicación de astrovirus. Estudios similares con el coronavirus IBV (virus de bronquitis infecciosa) reportaron que la proteína no estructural 14 del virus interactúa con DDX1, una RNA helicasa celular perteneciente a la familia DExD/H. La replicación de este virus disminuyó por la manipulación de DDX1 tanto por RNA de interferencia como por la sobreexpresión de un mutante dominante negativo de DDX1 (Xu *et al.*, 2010).

Los fosfoinosítidos (PI) son fosfolípidos que median cascadas de señalización en la célula uniéndose a proteínas efectoras. La fosforilación reversible del anillo de inositol en las posiciones 3, 4 y 5 provoca la síntesis de 7 diferentes fosfoinosítidos y cada uno de ellos tiene una distribución subcelular única (Delang *et al.*, 2012). Estos lípidos juegan un papel importante en reclutar y regular la función de proteínas en la interfase de la membrana (Di Paolo *et al.*, 2006). Por ejemplo, la proteína PI4KIII A es indispensable para la replicación de HCV, en particular para mantener la integridad estructural de las membranas donde se encuentra el complejo de replicación (Lim *et al.*, 2011). En el caso de

---

los enterovirus se ha reportado que la proteína viral 3A aumenta el reclutamiento de PIK4IIB a las membranas del retículo endoplásmico, lugar donde la enzima cataliza la síntesis de lípidos PI4P, generando así un microambiente de membranas enriquecidas en este fosfolípido, el cual a su vez aumenta el reclutamiento de la RNA polimerasa 3Dpol, lo que lleva a la formación del complejo de replicación y al inicio de la síntesis de RNA en esas membranas (Hsu *et al.*, 2010). Aunque no se ha dilucidado completamente la función de las isoformas alfa y beta de la enzima PI4KIII, se ha mostrado que los lípidos PI4P pueden localmente cambiar la curvatura de la membrana (McMahon *et al.*, 2005,) al parecer para proteger las proteínas y el RNA viral de la defensa del hospedero (Stapleford *et al.*, 2010), así como para proveer sitios de unión a proteínas virales o del hospedero en la membrana, para la síntesis eficiente de RNA (Delang *et al.*, 2012). Aunque se requieren estudios adicionales para determinar la importancia de la acumulación de PI4P en astrovirus, nuestros resultados mostraron que el silenciamiento de PI4KIII causó una disminución en la replicación de RNA, síntesis de VP90 y rendimiento viral, sin embargo, no sabemos el mecanismo o en que paso exacto del ciclo de replicación de astrovirus la proteína PI4KIII sea importante.

El paso preciso del ciclo de replicación de astrovirus que es favorecido por los factores celulares identificados en este trabajo es difícil de determinar. Tras la infección, el RNA genómico se traduce para sintetizar las poliproteínas no estructurales, las cuales después de ser procesadas proteolíticamente dan origen a la RNA polimerasa dependiente de RNA y a otras proteínas virales que forman el complejo de replicación. Este complejo, a su vez, sintetiza el RNA antigenómico usando como templado el RNA genómico. El RNA antigenómico es entonces copiado por el complejo de replicación en más moléculas de RNA genómico y también sirve como templado para sintetizar el RNA subgenómico, que codifica para las proteínas estructurales del virus. La observación de que la síntesis del RNA antigenómico se altera de manera más pronunciada en relación al RNAg, en la mayoría de los genes evaluados en este trabajo, sugiere que las proteínas identificadas como factores requeridos para la replicación de astrovirus son necesarios directamente o indirectamente para favorecer la síntesis de RNA antigenómico. Además, la interferencia

---

## 14. CONCLUSIONES

1. Mediante electroforesis zonal de flujo libre se separaron tres poblaciones de membranas en las células Caco-2 y se encontraron los componentes virales exclusivamente en la población II de membranas.
2. En las células Caco-2 infectadas con astrovirus Yuc8 se identificaron proteínas celulares relacionadas en gluconeogénesis, oxidación de ácidos grasos, proceso biosintético de ácidos grasos de cadena larga y el ciclo de ácidos tricarboxílicos.
3. La disminución en la expresión de las proteínas DHCR7, FASN, CYP51A1, PI4KIIIIB, ITPR3 Y DDX23 causó una disminución en la síntesis de RNA genómico y antigenómico, así como también, en la síntesis de la proteína estructural VP90, lo que sugiere que estas proteínas tienen una función en la replicación del RNA viral y/o el ensamble de las partículas virales.



---

con la síntesis de las cadenas negativa y/o positiva del RNA durante la replicación del genoma viral llevaría en ambos casos a la disminución tanto del RNA genómico como antigenómico, con la concomitante reducción del RNA subgenómico, lo que a su vez causaría una disminución de la síntesis de la proteína estructural VP90 y de la progenie viral. Por lo tanto, es necesario caracterizar con mayor detalle la función de las proteínas celulares identificadas para definir en más detalle su papel en el ciclo de replicación viral, aunque es razonable asumir que las enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos podrían ser requeridas para proveer un ambiente membranoso necesario para el eficiente proceso de replicación del RNA, y para participar en la producción de energía a partir de los ácidos grasos durante la replicación viral, como ha sido reportado para otros virus.

En resumen, los resultados presentados en este trabajo sugieren fuertemente que la replicación eficiente del genoma de astrovirus y el ensamble de las partículas virales se lleva a cabo en asociación con membranas posiblemente derivadas de diferentes organelos, explotando durante estos procesos el metabolismo de lípidos de la célula. El mecanismo a través del cual los genes encontrados en este trabajo contribuyen a una exitosa infección viral no se conoce, pero su identificación provee las bases para estudios subsecuentes que permitirán profundizar en nuestro conocimiento sobre la replicación de este importante patógeno.

---

## 15. PERSPECTIVAS

1. Identificar cual de las proteínas no estructurales induce los rearrreglos de membrana en la célula.
2. Determinar de que organelos provienen las membranas utilizadas por astrovirus para formar las estructuras donde lleva a cabo la replicación y ensamble.
3. Determinar los cambios ultra estructurales en los organelos de las células infectadas.
4. Determinar en cuál tipo de membranas se lleva a cabo la replicación del RNA y en cuáles el ensamble de las partículas virales.
5. Determinar el mecanismo por medio del cual las proteínas DHCR7, CYP51A1, FASN, PI4KIIIB, ITPR3 Y DDX23 participan en la replicación de astrovirus.
6. Determinar cómo está formado el complejo de replicación de astrovirus en las células.
7. Evaluar el cambio del metabolismo de los lípidos en las células infectadas con astrovirus.

---

## 16. REFERENCIAS

**Ahlquist P, Noueir AO, Lee WM, Kushner DB, Dye BT.** 2003. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol.* 77(15):8181-6.

**Ahlquist P.** 2006. Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat Rev Microbiol.* 4:371-82.

**Axis Shield b.** News Bulletin for Axix-Shield Density Gradient Media. Biological separations. Issue 10, 2009.

**Axis Shield c.** News Bulletin for Axix-Shield Density Gradient Media. Biological separations. Issue 16, 2009.

**Axis-Shield a.** Density gradient media. Application and products 2015. <http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/Applications%20and%20Products%202015%20General.pdf>

**Banos-Lara Mdel R, Méndez E.** 2011. Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism. *Virology.* 401: 322-32.

**Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O.** 2007. Enhanced separation of membranes during free flow zonal electrophoresis. *Plants Anal Chem.* 79:5181-5187.

**Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O.** 2012. Protein profiling of epidermal bladder cells from the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Proteomics.* 12:2862-5.

**Bass DM, Qiu S.** 2000. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *J Virol.* 74: 1810-4.

**Behling-Kelly E, Schultz-Cherry S, Koci M, Kelley L, et al.** 2002. Localization of astrovirus in experimentally infected turkeys as determined by in situ hybridization. *Vet Pathol.* 39: 595-8.

**Belliot G, Laveran H, Monroe SS.** 1997. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch Virol.* 142:1323-34.

**Belov GA, Feng Q, Nikovics K, Jackson CL, Ehrenfeld E.** 2008. A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog.* 4: e1000216. doi:10.1371/journal.ppat.1000216.

**Belov GA, Nair V, Hansen BT, Hoyt FH, Fischer ER, Ehrenfeld E.** 2012. Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol.* 86: 302-312.

---

**Berger KL, Cooper JD, Heaton NS, Yoon R, Oakland TE, Jordan TX, Mateu G, Grakoui A, Randall G.** 2009. Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**:7577–7582.

**Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman WH, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J.** 2009. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics.* **25**:1091-1093.

**Blackham S, Baillie A, Al-Hababi F, Remlinger K, You S, Hamatake R, McGarvey MJ.** 2010. Gene expression profiling indicates the roles of host oxidative stress, apoptosis, lipid metabolism, and intracellular transport genes in the replication of hepatitis C virus. *J Virol.* **84**:5404-14.

**Blomström AL, Widén F, Hammer AS, Belák S, et al.** 2013. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol.* **48**: 4392-6.

**Brown JR, Morfopoulou S, Hubb J, Emmett WA, et al.** 2015. Astrovirus VA1/HMO-C: An Increasingly Recognized Neurotropic Pathogen in Immunocompromised Patients. *Clin Infect Dis.* 2015. **60**:881-8.

**Canut H, Bauer J, Weber G.** 1999. Separation of plant membranes by electromigration techniques. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **722**:121-39.

**Cherry S, Doukas T, Armknecht S, Whelan S, Wang H, Sarnow P, Perrimon N. et al.** 2005. Genome-wide RNAi screen reveals a specific sensitivity of IRES-containing RNA viruses to host translation inhibition. *Genes Dev.* **19**: 445–452.

**Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, Christmas R, Avila-Campilo I, Creech M, Gross B, Hanspers K, Isserlin R, Kelley R, Killcoyne S, Lotia S, Maere S, Morris J, Ono K, Pavlovic V, Pico AR, Vailaya A, Wang PL, Adler A, Conklin BR, Hood L, Kuiper M, Sander C, Schmulevich I, Schwikowski B, Warner GJ, Ideker T, Bader GD.** 2007. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc.* **2**:2366-2368.

**De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G.** 2011. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol.* **11**:1529-44.

**de Chasseay, B, Navratil V, Tafforeau L, Hiet MS, et al.** 2008. Hepatitis C virus infection protein network. *Mol. Syst. Biol.* **4**: 230.

---

**Delang L, Paeshuyse J, Neyts J.** 2012. The role of phosphatidylinositol 4-kinases and phosphatidylinositol 4-phosphate during viral replication. *Biochem Pharmacol.* **84**:1400–1408.

**Di Paolo G, De Camilli P.** 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature.* **443**:651–657.

**Diamond DL, Syder AJ, Jacobs JM, Sorensen CM, Walters KA, Proll SC, McDermott JE, Gritsenko MA, Zhang Q, Zhao R, Metz TO, Camp DG 2nd, Waters KM, Smith RD, Rice CM, Katze MG.** 2010. Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics. *PLoS Pathog.* **6**(1):e1000719.

**Dong J, Dong L, Méndez E, Tao Y.** 2011. Crystal structure of the human astrovirus capsid spike. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**: 12681-6.

**Dryden KA, Tihova M, Nowotny N, Matsui SM, et al.** 2012. Immature and mature human astrovirus: structure, conformational changes, and similarities to hepatitis E virus. *J Mol Biol.* **422**: 650-8.

**DuBois RM, Freiden P, Marvin S, Reddivari M, et al.** 2013. Crystal structure of the avian astrovirus capsid spike. *J Virol.* **87**: 7853-63.

**Egger D, Bienz K.** 2005. Intracellular location and translocation of silent and active poliovirus replication complexes. *J Gen Virol.* **86**: 707-718.

**Ehrlich LS, Medina GN, Khan MB, Powell MD, Mikoshiba K, Carter CA.** 2010. Activation of the inositol (1,4,5)-triphosphate calcium gate receptor is required for HIV-1 Gag release. *Lorna S. J Virol.* **84**:6438–6451.

**El-Hage N, Luo G.** 2003. Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *J Gen Virol.* **84**:2761–2769.

**Finkbeiner SR, Kirkwood CD, Wang D.** 2008. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *Virol J.* **5**:117.

**Finkbeiner SR (a), Le BM, Holtz LR, Storch GA, Wang D.** 2009. Detection of newly described astrovirus MLB1 in stool samples from children. *Emerg Infect Dis.* **15**:441-4.

**Finkbeiner SR (b), Li Y, Ruone S, Conrardy C, Gregoricus N, Toney D, Virgin HW, Anderson LJ, Vinje J, Wang D, Tong S.** 2009. Identification of a novel Astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *J Virol* **83**:10836-9.

---

**Firth AE, Atkins JF.** 2010. Candidates in Astroviruses, Seadornaviruses, Cytorhabdoviruses and Coronaviruses for +1 frame overlapping genes accessed by leaky scanning. *J Virol.* **7**: 17.

**Fontana J, López-Iglesias C, Tzeng WP, Frey TK, Fernández JJ, Risco C.** 2010. Three-dimensional structure of Rubella virus factories. *Virology.* **405**: 579-591.

**Frolova EI, Gorchakov R, Pereboeva L, Atasheva S, Frolov I.** 2010. Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *J Virol.* **84**: 11679-95.

**Fuentes C (a), Bosch A, Pintó RM, et al.** 2012. Identification of human astrovirus genome-linked protein (VPg) essential for virus infectivity. *J Virol.* **86**: 10070-8.

**Fuentes C (b), Guix S, Bosch A, Pintó RM.** 2011. The C-terminal nsP1a protein of human astrovirus is a phosphoprotein that interacts with the viral polymerase. *J Virol.* **85**:4470–9.

**Geigenmuller U, Chew T, Ginzton N, et al.** 2002. Processing of non- structural protein 1a of human astrovirus. *J Virol.* **76**: 2003–2008.

**Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM.** 2010. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J Virol.* **84**: 10438-10447.

**Gough RE, Collins MS, Borland E, Keymer LF.** 1984. Astrovirus-like particles associated with hepatitis in ducklings. *Vet Rec.* **114**:279.

**Guix S, Caballero S, Bosch A, et al.** 2005. Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication. *Virology.* **333**:124–31.

**Guix S, Caballero S, Bosch A, Pintó RM.** 2004. C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA. *J Virol.* **78**:13627-36.

**Heaton NS (a), Perera R, Berger KL, Khadka S, Lacount DJ, Kuhn RJ, Randall G.** 2010. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**:17345-17350.

**Heaton NS (b) and Randall G.** 2010. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe.* **8**: 422–432.

**Heaton NS, Randall G.** 2011. Multifaceted roles for lipids in viral infection. *Trends Microbiol.* **19**:368-75.

---

**Heikkilä O, Susi P, Tevaluoto T, Härmä H, Marjomäki V, Hyypiä T, Kiljunen S.** 2020. Internalization of coxsackievirus A9 is mediated by 2-microglobulin, dynamin, and Arf6 but not by caveolin-1 or clathrin. *J Virol.* **84**:3666–3681.

**Hermens WT, ter Brake O, Dijkhuizen PA, Sonnemans MA, Grimm D, Kleinschmidt JA, Verhaagen J.** 1999. Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks for gene transfer in the nervous system. *Hum Gene Ther.* **10**:1885-91.

**Hoffmann P, Ji H, Moritz RL, et al.** 2001. Continuous free-flow electrophoresis separation of cytosolic proteins from the human colon carcinoma cell line LIM 1215: a non two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis strategy. *Proteomics.* **1**:807–18.

**Hsu NY, Ilnytska O, Belov G, Santiana M, Chen YH, Takvorian PM, Pau C, van der Schaar H, Kaushik-Basu N, Balla T, Cameron CE, Ehrenfeld E, van Kuppeveld FJ, Altan-Bonnet N.** 2010. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell.* **141**:799–811.

**Huys A, Thibault PA, Wilson JA.** 2013. Modulation of Hepatitis C Virus RNA accumulation and translation by DDX6 and miR-122 are mediated by separate mechanisms. *PLoS ONE.* **8**: e67437.

**Imada T, Yamaguchi S, Mase M, Tsukamoto K, Kubo M, Morooka A.** 2000. Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA. *J Virol.* **74**:8487-93.

**Jang SY, Jeong WH, Kim MS, Lee YM, Lee JI, Lee GC, Paik SY, Koh GP, Kim JM, Lee CH.** 2010. Detection of replicating negative-sense RNAs in Caco-2 cells infected with human astrovirus. *Arch Virol.* **155**:1383-9.

**Jiang B, Monroe SS, Koonin EV, Stine SE, Glass RI.** 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:10539–10543.

**Jiang Y, Serviene E, Gal J, Panavas T, Nagy PD.** 2006. Identification of essential host factors affecting tombusvirus RNA replication based on the yeast Tet promoters Hughes Collection. *J. Virol.* **80**, 7394–7404.

**Jonassen CM, Jonassen T TØ, Svein TM, Grinde B.** 2003. Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. *Virus Res.* **91**: 195-201.

**Jonassen CM, Jonassen TO, Grinde B.** 1998. A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhinovirus. *J Gen Virol.* **79**: 715-8.

---

**Kapoor A, Li L, Victoria J, Oderinde B, Mason C, Pandey P, Zaidi SZ, Delwart E.** 2009. Multiple novel astrovirus species in human stool. *J Gen Virol.* **90**: 2965-72.

**Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R.** 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* **74**:5383-92.

**Knoops K, Bárcena M, Limpens RW, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ.** 2012. Ultrastructural characterization of arterivirus replication structures: reshaping the endoplasmic reticulum to accommodate viral RNA synthesis. *J Virol.* **86**: 2474-2487.

**Knoops K, Kikkert M, Worm SH, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ.** 2008. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* **6**: e226.

**Koci MD, Moser LA, Kelley LA, et al.** 2003. Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. *J Virol.* **77**:11798-808.

**Koci MD, Seal BS, Schultz-Cherry S.** 2000. Molecular characterization of an avian astrovirus. *J Virol.* **74**:6173–6177.

**Kopek BG, Perkins G, Miller DJ, Ellisman MH, Ahlquist P.** 2007. Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biol.* **5**: e220.

**Krishna NK.** 2005. Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. *Viral Immunol.* **18**: 17-26.

**Krishnan MN, Ng A, Sukumaran B, Gilfoy FD, Uchil PD et al.** 2008. RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* **455**: 242–245.

**Kujala P, Ikäheimonen A, Ehsani N, Vihinen H, Auvinen P, Kääriäinen L.** 2001. Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *J Virol.* **75**: 3873-3884.

**Lee CJ, Lin HR, Liao CL, Lin YL.** 2008. Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *J Virol.* **82**:6470–6480.

**Li L, Diab S, McGraw S, Barr B, Traslavina R, et al.** 2013. Divergent astrovirus associated with neurologic disease in cattle. *Emerg Infect Dis.* **19**:1385-92.

**Li Z, Pogany J, Panavas T, Xu K, Esposito AM, Kinzy TG, Nagy PD.** 2009. Translation Elongation Factor 1A is a component of the tombusvirus replicase complex and affects the stability of the p33 replication co-factor. *Virology.* **385**:245–260.



---

**Lim YS, Hwang SB.** 2011. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with phosphatidylinositol 4-kinase type III{alpha} and regulates viral propagation. *J Biol Chem.* **286**:11290–11298.

**Limpens RW, van der Schaar HM, Kumar D, Koster AJ, Sni-jder EJ, van Kuppeveld FJ, Bárcena M.** 2011. The transformation of enterovirus replication structures: a three-dimensional study of single- and double-membrane compartments. *MBio* **2**: e00166-11.

**Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* **25**:402– 408.

**Lorizate M, Kräusslich HG.** 2011. Role of lipids in virus replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **3**:a004820.

**Mackenzie JM, Khromykh AA, Parton RG.** 2007. Cholesterol Manipulation by West Nile Virus Perturbs the Cellular Immune Response. *Cell Host Microbe.* **11**:229-39.

**Marczinke B, Bloys AJ, Brown TD, Willcocks MM, et al.** 1994. The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *J Virol.* **68**: 5588-95.

**McMahon HT, Gallop JL.** 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature.* **438**:590–596.

**Méndez E (a), Arias CF.** 2013. Astroviruses, p 609-628. In Knipe DM, Howley P (ed), *Fields Virology*, 6th ed, vol 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

**Méndez E (b), Murillo A, Velázquez R, Burnham A, Arias CF.** Replication cycle of astroviruses. In: Schultz-Cherry S, editor. *Astrovirus Research: Essentials Ideas, Everyday Impacts*. New York: Springer; 2013. p. 19-45.

**Méndez E, Fernández-Luna MT, López S, Méndez-Toss M, Arias C.** 2002. Proteolytic Processing of a Serotype 8 Human Astrovirus ORF2 Polyprotein. *J Virol.* **76**: 7996-8002.

**Méndez E, Muñoz-Yañez C, Sánchez-San Martín C, Aguirre-Crespo G, et al.** 2014. Characterization of human astrovirus cell entry. *J Virol.* **88**:2452-60.

**Méndez E, Salas-Ocampo E, Arias CF.** 2004. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J Virol.* **78**:8601–8608.

**Méndez E, Salas-Ocampo MP, Munguia ME, et al.** 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *J Virol.* **77**:11378–11384.

---

**Méndez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, Guiscafré H, Cedillo R, Muñoz O, Herrera I, López S, Arias CF.** 2004. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. *J Clin Microbiol.* **42**:151-7.

**Miller DJ, Schwartz MD, Ahlquist P.** 2001. Flock house virus RNA replicates on outer mitochondrial membranes in *Drosophila* cells. *J Virol.* **75**: 11664-11676.

**Miller S, Krijnse-Locker J.** 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nature reviews Microbiology.* **6**: 363-74.

**Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K.** 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* **9**:1089-97.

**Monroe SS, Stine SE, Gorelkin L, et al.** 1991. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. *J Virol.* **65**:641–648.

**Montero L. de Guevara H.** Métodos de Centrifugación. Instituto de Biotecnología. UNAM. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Centrifugacion.pdf>

**Morais ATS, Terzian ACB, Duarte DVB, Bronzoni RVM, Madrid MCFS, Gavioli AF, Gil LHVG, Oliveira AG, Zanelli CF, Valentini SR, Rahal P, Nogueira ML.** 2013. The eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L protein interacts with Flavivirus NS5 and may modulate yellow fever virus replication. *Virol J.* **10**:205.

**Moser LA, Carter M, Schultz-Cherry S.** 2007. Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication. *J Virol.* **81**: 11937-45.

**Naccache SN, Peggs KS, Mattes FM, Phadke R, et al.** 2015. Diagnosis of Neuroinvasive Astrovirus Infection in an Immunocompromised Adult With Encephalitis by Unbiased Next-Generation Sequencing. *Clin Infect Dis.* **60**:919-23.

**Nagy PD, Pogany J.** 2011. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat Rev Microbiol.* **10**:137-49.

**Nasheri N, Joyce M, Rouleau Y, Yang P, Yao S, Tyrrell DL, Pezacki JP.** 2013. Modulation of fatty acid synthase enzyme activity and expression during hepatitis C virus replication. *Chem Biol.* **20**:570–582.

**Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R.** 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* **75**:4646-58.

---

**Panavas T, Serviene E, Brasher J, Nagy PD.** 2005. Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 7326–7331.

**Paul D, Bartenschlager R.** 2013. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol.* **2**: 32-48.

**Perera R, Riley C, Isaac G, Hopf-Jannasch AS, Moore RJ, Weitz KW, Pasa-Tolic L, Metz TO, Adamec J, Kuhn RJ.** 2012. Dengue Virus Infection Perturbs Lipid Homeostasis in Infected Mosquito Cells. *PLoS Pathog.* **8**(3):e1002584.

**Quan PL, Wagner TA, Briese T, Torgerson TR, et al.** 2010. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg Infect Dis.* **16**: 918-25.

**Romero-Brey I, Bartenschlager R.** 2014. Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. *Viruses.* **6**:2826-57

**Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, Santarella-Mellwig R, Habermann A, Hoppe S, Kallis S, Walther P, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R.** 2012. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* **8**: e1003056 .

**Sasaki J, Ishikawa K, Arita, M, Taniguchi K.** 2012. ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to picornavirus RNA replication sites. *EMBO J.* **31**:754–766.

**Schlegel A, Giddings TH, Ladinsky MS, Kirkegaard K.** 1996. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol.* **70**: 6576-6588.

**Sessions, OM, Barrows NJ, Souza-Neto JA, Robinson TJ, Hershey CL, et al.** 2009. Discovery of insect and human dengue virus host factors. *Nature.* **458**: 1047–1050.

**Sharma M, Sasvari Z, Nagy PD.** 2010. Inhibition of Sterol Biosynthesis Reduces Tombusvirus. Replication in Yeast and Plants. *J Virol.* **84**:2270–2281.

**Shimizu, M., J. Shirai, M. Narita, and T. Yamane.** 1990. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. *Journal of clinical microbiology* **28**: 201-6.

**Soto-Rifo R, Rubilar PS, Ohlmann T.** 2013. The DEAD-box helicase DDX3 substitutes for the cap-binding protein eIF4E to promote compartmentalized translation initiation of the HIV-1 genomic RNA. *Nucleic Acids Res.* **41**:6286-99.

**Stapleford KA, Miller DJ.** 2010. Role of cellular lipids in positive-sense RNA virus replication complex assembly and function. *Viruses.* **2**:1055–1068.

---

**von Mering C, Huynen M, Jaeggi D, Schmidt S, Bork P, Snel B.** 2003. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res.* **31**:258-61.

**Walter JE, Briggs J, Guerrero ML, Matson DO, Pickering LK, Ruiz-Palacios G, Berke T, Mitchell DK.** 2001. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Arch. Virol.* **146**:2357–2367.

**Weber G, Wildgruber M.** 2004. A Versatile Free-Flow Electrophoresis System for Proteomics Applications. American Biotechnology Laboratory.

**Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R.** 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* **5**: 365-375.

**Willcocks MM, Ashton N, Kurtz JB, Cubitt WD, et al.** 1994. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *J Virol.* **68**: 6057-8.

**Willcocks MM, Boxall AS, Carter MJ.** 1999. Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins. *J Gen Virol.* **80**:2607–2611.

**Willcocks MM, Carter MJ.** 1993. Identification and sequence determination of the capsid protein gene of human astrovirus serotype 1. *FEMS Microbiol Lett* **114**:1–7.

**Wolfaardt M, Kiulia NM, Mwenda JM, Taylor MB.** 2011. Evidence of a recombinant wild-type human astrovirus strain from a Kenyan child with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* **49**:728–731.

**Xia W, Zhang J, Ostaszewski BL, Kimberly WT, Seubert P, Koo EH, Shen J, Selkoe DJ.** 1998. Presenilin 1 regulates the processing of beta-amyloid precursor protein C-terminal fragments and the generation of amyloid beta-protein in endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochemistry.* **37**:16465–16471.

**Xu L, Khadijah S, Fang S, Wang L, Tay FP, Liu DX.** 2010. The Cellular RNA Helicase DDX1 Interacts with Coronavirus Nonstructural Protein 14 and Enhances Viral Replication. *J Virol.* **84**:8571-8583.

**Zischka H, Weber G, Weber PJ, et al.** 2003. Improved proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria by free-flow electrophoresis. *Proteomics.* **3**:906–16.

**Tabla Anexa 2.** Lista de oligonucleótidos utilizados para PCR semicuantitativo y de tiempo real en este estudio.

Nombre del gen <sup>a</sup>	Secuencia (5' - 3')
GAPDH	ACCTGACCTGCCGTCTAGAAA CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT
ARF6	GAAGGTGCTATCCAAAATCTTCGGG CCCACAGTGGGAATGGTGGTCA
ARL1	ATGGGTGGCTTTTTCTCAAGTATATTTTCC GTAGTAACAACCTTCTCCCACTTGTAACTGTGA
CDS2	CGCACCCCTGCCAGTCTCTGCAGAT GGCCAAAGTCAGGATGCCTCTCACCC
CYP51A1	TGGGATGCTGCTGCTGGGCTTG GGTAGACCAGGCTGAGGGTGAAGGCG
DDX23	ATGGCAGGAGAGCTGGCTGACAAAAAGGAC CTTTAGATGGGGAAGACTTCCGGTCCCGGTCTCTAT
DHCR7	CAACCCAAACATTCCCAAAGCCAAGAGTCTAGAT CTAGACTCTTGGCTTTGGGAATGTTGGGTTGCG
EIF6	ATGGCGGTCCGAGCTTCGTTT GTGCACCACGGGGATGGTATCGG
FASN	AGGACCTGTCTAGTTTGATGCCTCCTTCTTCG GTGTGTGTTTCTCGGAGTGAATCTGGGTTGATG
ITPR3	CCGTCAATGGCTTCATCAGCACTTTGG CTGGGCCGAGTAGCGGTTTATGG
PI4KIIIa	TGGGTAGAAGAAAGCACAGCTCGGAAAGGCAGA ACCTGCAAAAAGCACCTCTAAAATCTCATCCCTAAGTGAAG
PI4KIIIb	CACCACCAGTGTCCCTGCC TCATGGGTAATACCACATTTCGGGCAAG
Orf1b genomic <sup>b</sup>	ATGAATTATTTTGATACTGAGGAAGATTACTTGGAA CTTTCTTGAGAAATAGATACCAAAGTACTTCAG
Orf1b antigenomic <sup>c</sup>	GCCATCACACTTCTTTGGTCTCCCTCCAAAT ATGGCGGAAGACCACCTTTTAAGGTATATGTGGAACA
Mon343 <sup>d</sup>	CAGGCTTTACCCACAT
Mon344 <sup>e</sup>	TACAGACATGTGCATGAATGG

<sup>a</sup> La primera columna corresponde a la abreviación del nombre completo del gen: ARF6, ADP-ribosylation factor 6; ARL1, ADP-ribosylation factor-like protein 1; CDS2, Phosphatidate cytidyltransferase 2; CYP51A1, lanosterol 14-alpha demethylase isoform 1; DHCR7, dehydrocholesterol reductase; DDX23, Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23; EIF6, Eukaryotic translation initiation factor 6; FASN, fatty acid synthase; ITPR3, Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3; PI4KIIIa, phosphatidylinositol 4-kinase III-ab; PI4KIIIb, PI4KIIIa, phosphatidylinositol 4-kinase III-b.

<sup>b</sup> nt 3227- 3262 en el genoma completo de astrovirus humano tipo 8

<sup>c</sup> nt 3321-3353 en la cadena complementaria del genoma completo de astrovirus humano tipo 8

<sup>d</sup> nt 3995–3980 en el genoma completo de astrovirus humano tipo 8

<sup>e</sup> nt 3677–3697 en la cadena complementaria del genoma completo de astrovirus humano tipo 8

---

## 17. TABLAS ANEXAS

**Tabla Anexa 1.** Lista de RNA pequeños de interferencia (siRNAs) utilizados en este estudio.

---

siRNA SMARTpool- siGENOME	Código Dharmacon
ARF6	M-004008-01-0005
ARL1	M-019265-00-0005
CDS2	M-009591-01-0005
CYP51A1	M-009215-01-0005
DDX23	M-019861-00-0005
DHCR7	M-020182-01-0005
EIF6	M-010096-01-0005
FASN	M-003954-04-0005
ITPR3	M-006209-02-0005
PI4KIIIa	M-006776-04-0005
PI4KIIIb	M-006777-03-0005

---

<http://dharmacon.gelifesciences.com>

---

**18. Anexo 1**

**Artículo: Identification of host cell factors associated with astrovirus replication in Caco-2 cells**

# Identification of Host Cell Factors Associated with Astrovirus Replication in Caco-2 Cells

Andrea Murillo,<sup>a</sup> Rosario Vera-Estrella,<sup>a</sup> Bronwyn J. Barkla,<sup>b</sup> Ernesto Méndez,<sup>a†</sup> Carlos F. Arias<sup>a</sup>

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México<sup>a</sup>; Southern Cross Plant Sciences, Southern Cross University, Lismore, NSW, Australia<sup>b</sup>

## ABSTRACT

Astroviruses are small, nonenveloped viruses with a single-stranded positive-sense RNA genome causing acute gastroenteritis in children and immunocompromised patients. Since positive-sense RNA viruses have frequently been found to replicate in association with membranous structures, in this work we characterized the replication of the human astrovirus serotype 8 strain Yuc8 in Caco-2 cells, using density gradient centrifugation and free-flow zonal electrophoresis (FFZE) to fractionate cellular membranes. Structural and nonstructural viral proteins, positive- and negative-sense viral RNA, and infectious virus particles were found to be associated with a distinct population of membranes separated by FFZE. The cellular proteins associated with this membrane population in infected and mock-infected cells were identified by tandem mass spectrometry. The results indicated that membranes derived from multiple cell organelles were present in the population. Gene ontology and protein-protein interaction network analysis showed that groups of proteins with roles in fatty acid synthesis and ATP biosynthesis were highly enriched in the fractions of this population in infected cells. Based on this information, we investigated by RNA interference the role that some of the identified proteins might have in the replication cycle of the virus. Silencing of the expression of genes involved in cholesterol (*DHCR7*, *CYP51A1*) and fatty acid (*FASN*) synthesis, phosphatidylinositol (*PI4KIIIβ*) and inositol phosphate (*ITPR3*) metabolism, and RNA helicase activity (*DDX23*) significantly decreased the amounts of Yuc8 genomic and antigenomic RNA, synthesis of the structural protein VP90, and virus yield. These results strongly suggest that astrovirus RNA replication and particle assembly take place in association with modified membranes potentially derived from multiple cell organelles.

## IMPORTANCE

Astroviruses are common etiological agents of acute gastroenteritis in children and immunocompromised patients. More recently, they have been associated with neurological diseases in mammals, including humans, and are also responsible for different pathologies in birds. In this work, we provide evidence that astrovirus RNA replication and virus assembly occur in contact with cell membranes potentially derived from multiple cell organelles and show that membrane-associated cellular proteins involved in lipid metabolism are required for efficient viral replication. Our findings provide information to enhance our knowledge of astrovirus biology and provide information that might be useful for the development of therapeutic interventions to prevent virus replication.

Astroviruses are common etiological agents of acute gastroenteritis in children and immunocompromised patients (1, 2). They have also been associated with neurological diseases in humans (3) and other mammals, like minks and cattle (4, 5). In birds, astroviruses cause different pathologies, manifesting as hepatitis in ducks (6) and poultry enteritis mortality syndrome (PEMS) in turkeys (7). There is no vaccine or specific antiviral therapy against astrovirus disease.

Astroviruses are small, nonenveloped viruses with a single-stranded positive-sense RNA [(+)RNA] genome (2). The virus genome has three open reading frames (ORFs), named ORF1a, ORF1b, and ORF2. ORF1a is translated into nsp1a, a nonstructural polyprotein precursor that is subsequently processed by viral and cellular proteases (2). ORF1b encodes nsp1b, the RNA-dependent RNA polymerase (2, 8). ORF2 encodes a precursor structural polyprotein, named VP90 in the human astrovirus (HAstV) serotype 8 (HAstV-8) strain Yuc8, which is proteolytically processed to produce the final capsid viral proteins VP34, VP27, and VP25 through a precursor polypeptide named VP70. ORF2 is expressed from a subgenomic RNA that is coterminal with the genomic RNA (RNAG) at the 3' end (2, 9).

Viruses interact with a large number of cellular proteins during their replication cycle (10). (+)RNA viruses take advantage of host cells by subverting host protein synthesis and remodeling membranes, co-opting and modulating protein and ribonucleoprotein complexes, and altering cellular metabolic pathways during infection (11). They utilize intracellular membranes to assem-

Received 12 May 2015 Accepted 28 July 2015

Accepted manuscript posted online 5 August 2015

Citation Murillo A, Vera-Estrella R, Barkla BJ, Méndez E, Arias CF. 2015. Identification of host cell factors associated with astrovirus replication in Caco-2 cells. *J Virol* 89:10359–10370. doi:10.1128/JVI.01225-15.

Editor: K. Kirkegaard

Address correspondence to Carlos F. Arias, [arias@ibt.unam.mx](mailto:arias@ibt.unam.mx).

† Deceased.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01225-15>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.01225-15



ble their RNA replication complexes, usually in conjunction with membrane vesicle formation or other membrane rearrangements to generate distinct organelle-like structures, designated viral replication factories (10, 12–14). The association with membranes provides advantages to virus replication: it protects replicating RNA from cellular nucleases; conceals replication-intermediate double-stranded RNA (dsRNA), thus preventing the induction of cellular innate immune responses; provides a scaffold that increases the local concentration of molecules involved in replication; and provides the proper topological orientation of replication complex components (12, 13).

Multiple approaches have been used to study the host factors involved in (+)RNA virus replication, including genome-wide screens (15, 16), riboproteomics (17), yeast two-hybrid screens (18, 19), and copurification of viral and cellular proteins to recognize host factors that are part of viral replication complexes or interact with viral replication proteins (11). Electron microscopy linked to electron tomography has become a powerful tool to determine structural changes in organelles and membrane rearrangements in infected cells (20–22).

Our group previously reported on the association of structural and nonstructural proteins, as well as viral RNA, with membranes derived from astrovirus-infected Caco-2 cells isolated using iodixanol density centrifugation (23), suggesting that astroviral RNA replication occurs in association with membranes. In this work, we further characterized the association of astrovirus with host cell membranes using free-flow zonal electrophoresis (FFZE), a versatile technique that allows the separation of membranes on the basis of the net surface charge during laminar flow through a thin aqueous layer (24, 25). Yuc8 structural and nonstructural proteins, as well as positive- and negative-sense viral RNA and infectious virus, were found to be associated with a distinct population of cell membranes derived from different organelles. A proteomic approach was used to identify the cellular proteins associated with this membrane population, and using RNA interference, the potential role which some of these proteins might have in the replication cycle of the virus in Caco-2 cells was investigated. Knocking down the expression of genes involved in cholesterol and fatty acid synthesis, phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism, and RNA helicase activity decreased the amount of Yuc8 genomic RNA and antigenomic RNA (RNAag) produced and the yield of the structural polyprotein precursor VP90 and of progeny virus, suggesting that astrovirus RNA replication and particle assembly take place in association with potentially different cellular membranes.

## MATERIALS AND METHODS

**Cells, virus, and reagents.** Cells of the colon adenocarcinoma Caco-2 cell line, obtained from the American Type Culture Collection, were propagated in a 10% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C with advanced Dulbecco modified essential medium (DMEM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) supplemented with nonessential amino acids (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) and 10% fetal bovine serum (FBS; Cansera, Ontario, Canada). HAstV serotype 8 strain Yuc8 was isolated in our laboratory, and it was grown as described previously (26). Small interfering RNAs (siRNAs; smart pools) were purchased from GE Healthcare Dharmacon (Lafayette, CO). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal and anti-mouse immunoglobulin antibodies were purchased from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA). Rabbit polyclonal antiserum to HAstV (Yuc8 strain) was previously described (27). Mouse and rabbit polyclonal antisera to the recombinant astrovirus Yuc8 proteins 1a-3 (amino acid

residues 401 to 638 of nsp1a) and 1b-2 (amino acid residues 201 to 362 of nsp1b), which recognize the protease and the RNA polymerase motifs, respectively, were produced in our laboratory (28). Rabbit polyclonal antibodies to the recombinant protein E4 (amino acid residues 666 to 782 of VP90) has been described previously (27).

**Infectivity assay.** For the infectivity assay, confluent Caco-2 cell monolayers were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 5 with trypsin (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA)-activated HAstV serotype 8 strain Yuc8 (26) and harvested at 18 h postinfection (hpi), unless otherwise indicated. The infected cells were detected by an immunoperoxidase focus-forming unit assay as described previously (27). Briefly, confluent monolayers of Yuc8-infected Caco-2 cells were fixed with ice-cold 100% methanol for 15 min at room temperature, and intracellular viral antigen was detected with a rabbit hyperimmune serum to Yuc8 virus, followed by incubation with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin polyclonal antibody. The binding of the secondary antibody was revealed with the substrate 3-amino-9-ethyl-carbazole (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), as previously described (29).

**Cell fractionation and FFZE membrane separation.** Membrane protein enrichment using iodixanol gradients was carried out as described previously (23). After sample ultracentrifugation, three visible bands above the 30% iodixanol interface were collected, pooled, and stored at –80°C; this procedure was repeated until a protein concentration of 30 mg/ml was reached. The proteins in the collected samples were analyzed by Western blotting with anti-Yuc8 antibody to confirm the presence of viral proteins. The pooled cellular membranes separated by the density gradient were fractionated by FFZE using a BD free-flow electrophoresis system (BD Proteomics, Germany) as previously described (24). Following separation in the chamber, membrane fractions were continually collected in 96-well deep-well microtiter plates at 4 ml/well (Sunergia Medical, Herndon, VA). The separation of membranes by FFZE was monitored along the run by collecting aliquots in microtiter plates (250 µl/well) at several time points and measuring the protein concentration (by determination of the optical density at 280 nm) using a microplate scanning spectrophotometer (Power WaveX; Bio-Tek Instruments, VT). The viral proteins in fractions separated by FFZE were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (see below). Pools of selected consecutive fractions (every two) were concentrated for Western blot analysis by centrifugation at 100,000 × g for 50 min at 4°C. The membrane pellets were resuspended in 150 µl of TN buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) and stored at –80°C until analyzed.

**ELISA.** The presence of viral proteins in the 96 fractions separated by FFZE was evaluated by ELISA. Fractions were bound to wells in a 96-well plate overnight at 4°C. The plate was then washed three times with phosphate-buffered saline (PBS)–1% bovine serum albumin (BSA) and blocked with 50 µl of this buffer for 1 h at 4°C. Then, 50 µl of primary antibody (either rabbit polyclonal antibodies to Yuc8 virus, antibodies to the recombinant protein E4, or antibodies to the recombinant protein 1a-3) was added and the mixture was incubated overnight at 4°C. The plates were then washed three times with PBS–1% BSA and incubated for 1 h at 37°C with 50 µl of alkaline phosphatase-labeled anti-rabbit immunoglobulin G conjugate. The plates were subsequently washed three times with PBS–1% BSA, the phosphatase substrate (1 mg/ml of *p*-nitrophenylphosphate [Sigma] in 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% diethanolamine buffer, pH 9.8) was added, and the plates were incubated at room temperature until the absorbance at 408 nm of the positive control, consisting of a lysate of Yuc8-infected Caco-2 cells, reached a value of 1.0.

**Immunoblotting.** The detection of proteins by Western blotting was carried out as described previously (23), using the primary antibodies indicated below.

**LC-MS/MS.** Combined FFZE fractions 17 and 18, 44 and 45, 46 and 47, 48 and 49, 52 and 53, and 78 and 79 were selected on the basis of the presence or absence of viral RNA. Fractions were precipitated with trichloroacetic acid and acetone. Briefly, 1.2 ml (600 µl of each of the two fractions) was mixed with 240 µl of Tris-EDTA (10 mM Tris HCl, 1 mM

EDTA, pH 8.0), 100  $\mu$ l 0.3% sodium deoxycholate, and 100  $\mu$ l of 72% trichloroacetic acid. After incubation for 2 h on ice, the samples were centrifuged at  $1,500 \times g$  for 20 min at 4°C. The supernatant was then aspirated, and the pellet was resuspended in 90% acetone at room temperature, followed by incubation at  $-20^\circ\text{C}$  overnight. Following precipitation, the samples were centrifuged as described above, the supernatant was aspirated, and the pellets were dried for 20 min in a Savant integrated SpeedVac system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The samples were sent to the Proteomics Facility at the Institut de Recherches Cliniques (Montreal, Canada). The samples were prepared, digested, and analyzed by nano-liquid chromatography (nano-LC)-tandem mass spectrometry (MS/MS) as previously described (30).

**Database search.** Tandem mass spectra were extracted by use of the Mascot Daemon application (version 2.2.2). All MS/MS spectra were analyzed using the Mascot server (Matrix Science, London, United Kingdom) and X! Tandem software (The GPM, version 2007.01.01.1 [the-gpm.org]). Mascot was set up to search the ipi\_HUMAN\_v3\_87 database (91,464 entries), assuming that digestion with trypsin was successful. Mascot and X! Tandem were searched with a fragment ion mass tolerance of 0.60 Da and a parent ion tolerance of 15 ppm. The iodoacetamide derivative of cysteine was specified as a fixed modification. The oxidation of methionine was specified as a variable modification (30).

**Criteria for protein identification.** Scaffold software (version Scaffold\_3.1.2; Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate the MS/MS-based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they exceeded the specific database search engine thresholds, calculated as  $-10 \log(P)$ , where  $P$  is the probability that the observed match between the experimental data and the database sequence is a random event. Mascot identification requires that ion scores be at least greater than the associated identity scores and 20, 15, and 15 for peptides with double, triple, and quadruple charges, respectively. X! Tandem identification requires at least  $-\log(\text{expected})$  scores of greater than 2.0. Peptide identifications were accepted if they could be established as specified by the Peptide Prophet algorithm at greater than 95% probability (31). Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 99% probability and contained at least two unique peptides (32). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated on the basis of MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony; i.e., when assembling peptides into proteins and protein groups, Scaffold software describes the minimum set of protein sequences that adequately accounts for all observed peptides.

**Construction of protein-protein interaction networks.** To map the identified proteins into the protein-protein interaction networks, the protein interaction data were gathered from the String database (version 9.1 [http://string.embl.de/]) (33), which includes experimental evidence of protein interactions, protein interaction databases, and text mining co-occurrences. The protein-protein interaction network was visualized using the Cytoscape program (version 3-0-2 [http://cytoscape.org]) (34), and statistical enrichment for specific Gene Ontology (GO) terms was performed using the ClueGO plug-in (version 2.1.3; Laboratory of Integrative Cancer Immunology) (35).

**siRNA transfection.** All siRNAs were from GE Healthcare Dharmacon (Lafayette, CO) (siGENOME, SMARTpool siRNA reagents). Caco-2 cells were transfected with siRNAs using an Amaxa electroporation system (Cologne, Germany) following the manufacturer's guidelines. One and a half million cells and 1.5  $\mu$ g of siRNA were used per electroporation. Seventy-two hours later, the transfection mixture was removed and the cells were washed twice with minimum essential medium (MEM) and infected with astrovirus at an MOI of 5. At 18 hpi the cells were harvested in Laemmli sample buffer for Western blotting or in the TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) for RNA extraction.

**LDH cell viability assay.** Cell viability was determined with a commercial kit (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). At 72 hpi, the cell culture medium from the different experimental conditions was collected and stored at 4°C. The cell monolayer was then lysed according to the manu-

facturer's protocol. The supernatant and 1/10 of the cell fraction were independently mixed with the assay mixture and kept at room temperature for 30 min. The lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined on the basis of the optical density of the samples, using the total LDH activity (from the medium and cells) as a control, and the data were expressed as a percentage of the total activity.

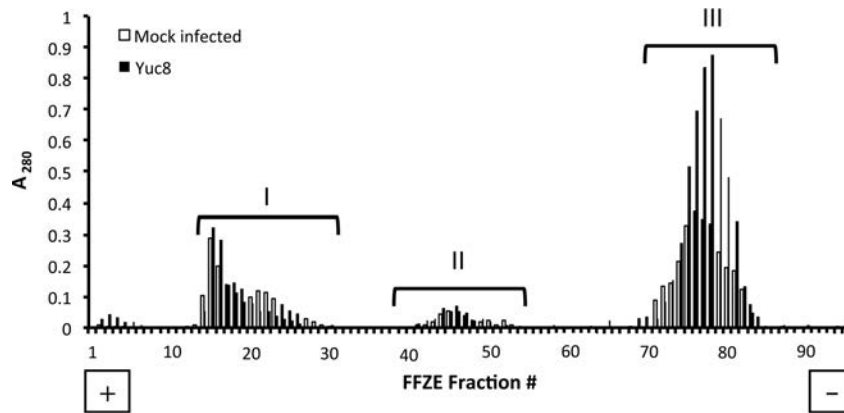
**Viral RNA analysis.** Total extracted cellular RNA was reverse transcribed with SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) using oligonucleotides Mon344(-) or Mon343(+) (see Table S1 in the supplemental material) (23, 36), yielding an amplicon of 316 bp.

**qRT-PCR analysis.** Purified total RNA extracted from cell lysates was treated with RNase-free DNase (Roche, Basel, Switzerland) to eliminate possible DNA contamination. Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) was performed with a first-strand cDNA synthesis kit and Maxima SYBR green quantitative PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the standard protocol described in the instructions accompanying the kit. Quantitative analysis of the data was performed using the Prism 7000 analysis software program (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA). The primers used to amplify *ARF6*, *ARL1*, *DHCR7*, *CYP51A1*, *FASN*, *PI4KIII $\alpha$* , *PI4KIII $\beta$* , *CDS2*, *ITPR3*, *DDX23*, *EIF6*, and *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) cellular mRNAs and ORF1b astrovirus Yuc8 RNA are listed in Table S1 in the supplemental material. The results were normalized to the level of total *GAPDH* mRNA detected in each RNA sample. The relative fold changes in gene expression were calculated by the  $2\Delta\Delta\text{CT}$  method, where  $C_T$  is the threshold cycle (37). The results presented are from three independent experiments, and statistical significance was determined with an unpaired two-tailed Student's  $t$  test.

## RESULTS

**FFZE separates membrane-associated proteins from astrovirus-infected Caco-2 cells in three different populations.** In a previous report, our group described the presence of astrovirus Yuc8 RNA polymerase in low-density fractions of iodixanol gradients of virus-infected Caco-2 cell homogenates, suggesting its association with cellular membranes (23). To further characterize the interaction of infectious astrovirus and astrovirus components with cell membranes, we separated the pooled cellular membranes of Yuc8-infected cells obtained from iodixanol gradients by free-flow zonal electrophoresis (FFZE). Three distinct protein populations (populations I to III) were observed in fractions collected from both infected and mock-infected Caco-2 cells (Fig. 1). Quantification of the proteins present in these populations showed differences in migration and concentration in infected cells from those in noninfected cells, suggesting that a difference in the distribution of cellular membranes between these two experimental conditions may exist. These differences were most obvious in population III (Fig. 1), although this population did not contain viral components (see below).

**Infectious virus and viral components are present exclusively in FFZE membrane population II.** To determine the distribution of viral components among the three membrane populations separated by FFZE, the presence of astrovirus proteins, RNA, and infectious viral particles was determined. The distribution of the structural protein VP90 and the nonstructural protein nsp1a was detected by ELISA with antibodies to purified viral particles (anti-Yuc8) and to the viral protease motif (anti-1a3), respectively. The viral proteins were found only in membrane population II, specifically, between fractions 41 and 54 (Fig. 2A and B). The distribution of viral proteins was also analyzed by immunoblotting using antibodies to VP90 (anti-Yuc8), the viral



**FIG 1** Separation of Caco-2 cell membranes by free-flow zonal electrophoresis. The three membrane-containing, low-density bands observed in iodixanol gradients of Yuc8-infected and uninfected lysed Caco-2 cells were pooled and separated by FFZE as described in Materials and Methods. The optical density at 280 nm of each fraction collected from the FFZE fraction collector was measured as an indicator of the protein content. Closed bars, samples from infected cells; open bars, samples from mock-infected cells; I, II, and III, the three different membrane populations. The positions of the cathode (–) and the anode (+) are indicated. The traces shown are representative of those from three biological replicates.

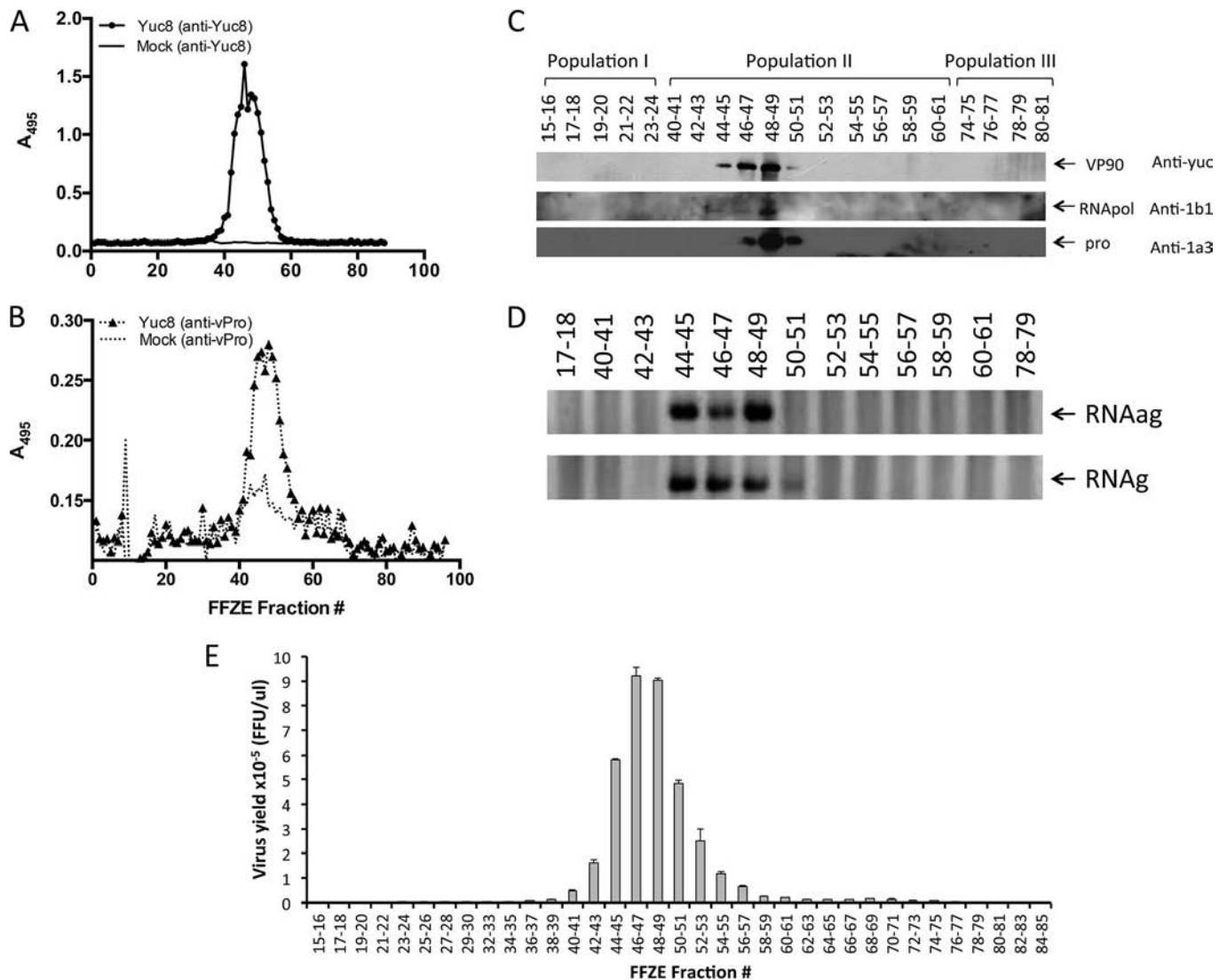
RNA polymerase (anti-1b1), and the viral protease (anti-1a3). The peak abundance of VP90 was detected in fractions 46 to 49, while the RNA polymerase and protease were most abundantly found in fractions 48 and 49 (Fig. 2C). These results confirm the specific presence of viral proteins detected by ELISA in membrane population II, mainly in fractions 46 to 49.

The distribution of negative-sense viral RNA strands (antigenomic RNA [RNA<sub>g</sub>]) and positive-sense viral RNA strands (genomic RNA [RNA<sub>g</sub>]) in the combined FFZE fractions of membrane population II, as well as in representative fractions of membrane populations I and III, was also determined by semiquantitative RT-PCR. Reverse transcription was performed with either oligonucleotide Mon343(+) or Mon344(–) (see Materials and Methods) to synthesize cDNA from negative- or positive-strand RNA, respectively. After inactivation of the reverse transcriptase, the synthesized cDNA was amplified by PCR using both the Mon343(+) and Mon344(–) primers in each case (see Materials and Methods). As shown in Fig. 2D, both genomic and antigenomic RNAs were detected in fractions 44 to 49, supporting the idea that astrovirus genome replication occurs in association with membranes (23). Finally, the potential association of infectious particles with FFZE membrane fractions was also evaluated. Infectious virus was mainly detected in fractions 42 to 55, with the highest viral titer being found between fractions 46 and 49 of membrane population II, although negligible amounts of virus (<0.1% of the total infectivity) were also detected in some fractions in population III (Fig. 2E). Altogether, these results show that RNA replication and the assembly of new viral particles occur in association with membrane population II, particularly in fractions 46 to 49, where the relative amount of viral components is enriched. Fractions 44 and 45 are also of interest since they contain high concentrations of RNA, some viral protein, but only a small fraction of the overall viral infectivity.

**Proteomic analysis of FFZE membrane population II showed the presence of unique proteins involved in different biological processes.** To identify cellular proteins that might be involved in astrovirus replication, the proteins present in pooled FFZE fractions 44 and 45, 46 and 47, 48 and 49, and 52 and 53 of Yuc8-infected and mock-infected cells were analyzed by shotgun

LC-MS/MS. In addition, fractions 17 and 18 (membrane population I) and 78 and 79 (membrane population III) were also analyzed for comparison of their proteins to the proteins associated with the fractions in population II. The resulting fragment ion spectra were searched against those in databases of human proteins. The proteins identified in each of the pooled fractions analyzed are shown in Tables S2 and S3 in the supplemental material for astrovirus-infected and mock-infected cells, respectively. A total of 615 and 660 proteins were identified in membrane population II of infected and mock-infected cells, respectively, with an overlap of 528 proteins. Seventy-nine of these proteins were identified only in infected cells, and 127 were exclusively found in mock-infected cells (see Table S4 in the supplemental material). Our analysis next focused on pooled fractions 48 and 49, where the largest amounts of infectious virus and viral components were found. Out of the 79 proteins identified solely in membrane population II of infected cells, 11 were present uniquely in fractions 48 and 49 (Table 1; see also Table S4 in the supplemental material). On the other hand, when the fragment ion spectra were searched against the spectra in a viral sequence database, the astrovirus capsid protein and the nonstructural polyproteins nsp1a and nsp1b were identified in fractions 44 to 53 of infected cells (confirming the data presented in Fig. 2) but not in fractions 17 and 18 or 78 and 79 of infected cells or in any fraction from uninfected cells analyzed (not shown), confirming that viral proteins are present exclusively in membrane population II.

The biological processes and molecular functions of proteins identified in fractions 48 and 49 of infected and uninfected cells were determined and mapped in a protein-protein interaction network using the String database and visualized using the Cytoscape program. Most of the functional characteristics of these proteins, as expected, were shared between infected and uninfected cells, suggesting that astrovirus infection does not perturb, at least significantly, cell metabolism. There were, however, different processes and functions overrepresented in infected cells, including ATP biosynthesis and fatty acid synthesis, processes that have been shown to be relevant for efficient infection of positive-sense viruses (Table 2) (38).



**FIG 2** Detection of viral RNA, viral proteins, and infectious viral particles in fractions separated by FFZE. Samples obtained by FFZE were analyzed by ELISA for the presence of the structural protein VP90 (anti-Yuc8) (A) and the viral protease (anti-vPro) (B) using anti-Yuc8 and anti-1a3 antibodies, respectively. (C) The FFZE fractions were pooled (2 fractions per pool, as indicated) and analyzed by Western blotting to detect VP90, the RNA polymerase (RNAPol), and the viral protease (pro), using anti-Yuc8, anti-1b1, and anti-1a3 antibodies, respectively. (D) RNA was extracted from pooled FFZE fractions, and reverse transcription was carried out with oligonucleotide Mon343(+) (top) to detect the negative-sense RNA or with oligonucleotide Mon344(-) (bottom) to detect the positive-sense RNA; PCR was carried out with the same pair of oligonucleotides. (E) The pooled fractions were treated with trypsin (200  $\mu$ g/ml) for 1 h at 37°C. The titer of infectious virus was determined by an immunoperoxidase focus-forming assay as described in Materials and Methods. The data shown are representative of those from three biological replicates.

**Membranes from different origins cosegregate with astroviral components in infected Caco-2 cells.** The results of analysis of the cellular compartment GO annotations for the proteins identified in Yuc8-infected membrane populations I (fractions 17 and 18), II (fractions 48 and 49), and III (fractions 78 and 79) are shown in Fig. 3. Analysis of the equivalent fractions from uninfected cells showed a distribution of the origin of cellular membranes very similar to that found in infected cells (not shown). Proteins associated with membranes of different origins were detected in all three populations. Of interest was the diversity of proteins detected in fractions 48 and 49 of population II. We were able to identify proteins from multiple membrane compartments, including the Golgi apparatus, endoplasmic reticulum (ER), mitochondria, and nucleus, as well as from the plasma membrane,

which were enriched in fractions 48 and 49; however, the possibility of a specific association of viral components with a specific type(s) of membrane(s) cannot be concluded from these data, and further experiments with a better resolution of cell organelles would be required to make the assignment.

**Lipid and phosphoinositol metabolism and a cellular RNA helicase activity are important for astrovirus replication.** Out of the 11 proteins exclusively identified in fractions 48 and 49 of infected cells (Table 3), 6 were selected to further characterize their possible participation in astrovirus replication. Five more proteins present in fractions 48 and 49 of infected cells, although they were not exclusive to these fractions, were also characterized. The selection was based on their involvement in the biosynthetic processes identified to be overrepresented in these FFZE fractions

**TABLE 1** Proteins found exclusively in fractions 48 and 49 of membrane population II from Yuc8-infected Caco-2 cells

Protein full name	UniProt accession no.
Eukaryotic translation initiation factor 6	P56537
ADP-ribosylation factor 6	Q5U025
Claudin-6	P56747
ADP-ribosylation factor-like protein 1	P40616
Sodium-dependent multivitamin transporter	B4DDE5
Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial isoform 2	P32322
Isoform 1 of ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	Q13404
Isoform 1 of serine/threonine-protein phosphatase 2A, 65-kDa regulatory subunit A beta isoform	P30154
Isoform 1 of phosphatidate cytidyltransferase 2	B4E3K6
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	Q59ES2
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	A8KA56

and on the role that similar proteins have been reported to play in the replication of other (+)RNA viruses (39–41). The selected proteins (Table 3) are involved in vesicular traffic (ADP-ribosylation factor 6 [ARF6], ADP-ribosylation factor-like protein

1 [ARL1]), cholesterol synthesis (lanosterol 14- $\alpha$  demethylase isoform 1 [CYP51A1], 7-dehydrocholesterol reductase [DHCR7]), fatty acid synthesis (fatty acid synthase [FASN]), phospholipid metabolism (phosphatidylinositol-4-kinase  $\alpha$  and  $\beta$  [PI4KIII $\alpha$  and PI4KIII $\beta$ , respectively]), isoform 1 of phosphatidate cytidyltransferase 2 [CDS2]), phosphoinositol binding (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 [ITPR3]), protein translation (eukaryotic translation initiation factor 6 [EIF6]), and RNA metabolism (ATP-dependent RNA helicase DDX23 [DDX23]).

The roles of the above-mentioned proteins in astrovirus replication were evaluated by knocking down the expression of the cognate genes by RNA interference. For this, Caco-2 cells were transfected with the corresponding siRNA or with an irrelevant siRNA as a control. At 72 h posttransfection, the cells were infected with Yuc8 (MOI, 5), and at 18 hpi the cells were subjected to three freeze-thaw cycles and the viral progeny was titrated as described in Materials and Methods. Silencing of the expression of the *CYP51A1*, *DHCR7*, *FASN*, *PI4KIII $\beta$* , *ITPR3*, and *DDX23* genes reduced the yield of virus progeny between 40 and 50% (Fig. 4). The viability of the cells, determined by an LDH activity release assay, was not affected, and the reduction in gene expression induced by the corresponding siRNAs ranged from 40 to 80%, as

**TABLE 2** Gene Ontology annotation of proteins identified in FFZE fractions 48 and 49 of Yuc8-infected cells<sup>a</sup>

Process or function	Cells for which GO annotation was determined
<b>Biological processes</b>	
Generation of energy	Mock-infected cells
Glutamine metabolic process	Mock-infected cells
Hexose metabolic process	Mock-infected cells
Regulation of translation	Mock-infected cells
Respiratory electron transport chain	Mock-infected cells
Cell junction organization	Yuc8-infected cells
Cholesterol biosynthetic process	Yuc8-infected cells
<i>De novo</i> posttranslational folding	Yuc8-infected cells
Mitochondrial ATP synthesis-coupled proton transport	Yuc8-infected cells
mRNA metabolic process	Yuc8-infected cells
Protein localization in mitochondria	Yuc8-infected cells
SRP-dependent cotranslational protein targeting the membrane	Yuc8-infected cells
RNA processing	Yuc8-infected cells
Vesicle targeting to and from within Golgi apparatus	Yuc8-infected cells
Actin filament organization	Both mock-infected and Yuc8-infected cells
ATP biosynthetic process	Both mock-infected and Yuc8-infected cells
Glucose catabolic process	Both mock-infected and Yuc8-infected cells
Protein N-linked glycosylation	Both mock-infected and Yuc8-infected cells
Regulation of translation initiation	Both mock-infected and Yuc8-infected cells
<b>Molecular functions</b>	
Cytochrome <i>c</i> oxidase activity	Mock-infected cells
Nucleic acid binding	Mock-infected cells
Protein phosphatase binding	Mock-infected cells
rRNA binding	Mock-infected cells
Actin filament binding	Both mock-infected and Yuc8-infected cells
mRNA binding	Both mock-infected and Yuc8-infected cells
RNA binding	Both mock-infected and Yuc8-infected cells
Translation factor activity	Both mock-infected and Yuc8-infected cells
Unfolded protein binding	Both mock-infected and Yuc8-infected cells
Acetyl coenzyme A acetyltransferase activity	Yuc8-infected cells
ATPase activity to transmembrane movement of ions	Yuc8-infected cells
Hydrogen transporter activity	Yuc8-infected cells

<sup>a</sup> GO annotations were determined using the ClueGO plug-in in the protein-protein interaction network visualized by Cytoscape. SRP, signal recognition particle.

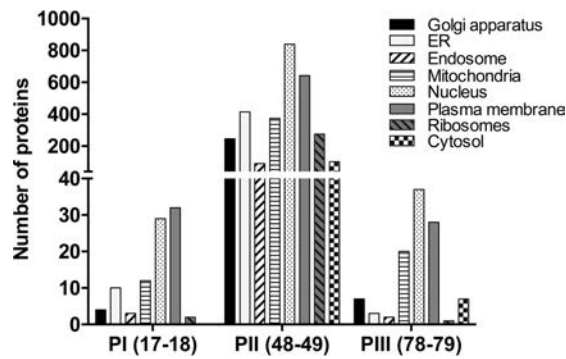


FIG 3 Gene Ontology annotation for the cell compartment of the proteins from FFZE fractions. The classification of proteins from fractions 17 and 18 (population I [PI]), 48 and 49 (population II [PII]), and 78 and 79 (population III [PIII]) is indicated. The analysis was performed using Scaffold software (version 4) as described in Materials and Methods.

determined by real-time quantitative RT-PCR of the target mRNA (data not shown).

To explore the stage of the astrovirus replication cycle affected by silencing the expression of the various genes, the synthesis of viral genomic RNA (RNAg) and antigenomic RNA (RNAag) was determined by real-time qRT-PCR. For this, Caco-2 cells transfected with siRNAs specific for *DHCR7*, *FASN*, *CYP51A1*, *ITPR3*, *PI4KIII $\beta$* , or *DDX23* were infected with astrovirus Yuc8 at an MOI of 5, and the cells were harvested at 12 hpi. The viral RNA was extracted and the abundance of RNAg and RNAag was determined as described in Materials and Methods. Silencing of the expression of these genes decreased the synthesis of RNAag from 75% (*CYP51A1* and *DDX23*) to more than 90% (*FASN*, *ITPR3*, and *PI4KIII $\beta$* ) (Fig. 5A), while the reduction of the level of RNAg was less pronounced, ranging from 35% for *DHCR7* and *CYP51A1* to about 60% for *FASN*, *ITPR3*, and *DDX23* and to 80% for *PI4KIII $\beta$* . The ratio of RNAg to RNAag ranged from 1.2-fold (*DDX23*) to 5.3-fold (*ITPR3*) (Fig. 5A). The ratio of RNAg to RNAag in cells treated with an irrelevant siRNA was about 200. The moderate effect of siRNAs on the reduction of virus yield and genomic and antigenomic viral RNAs observed may be explained by the partial knockdown of the specific gene expression achieved with the various siRNAs. Alternatively, the existence in some cases of redundant enzymatic activities or the presence of enzyme isoforms not affected by the employed siRNA might also contribute to the partial inhibition effect observed.

The synthesis of the structural polyprotein VP90 in Yuc8-infected siRNA-transfected cells was also evaluated by Western blot-

ting. At 12 hpi, the amount of accumulated VP90 ranged from 33 to 69% compared to the amount that accumulated in cells transfected with an irrelevant siRNA. The greatest effect on VP90 synthesis was observed after the expression of *FASN*, *ITPR3*, and *PI4KIII $\beta$*  was knocked down (Fig. 5B). This observation is in agreement with the finding that the cells transfected with siRNAs corresponding to these three genes showed the lowest level of RNAg. Similarly, there was a correlation between the levels of knockdown of the expression of *DHCR7* and *CYP51A1*, which resulted in a decrease in the amount of RNAg of less than 50% and a reduction in the amount of the accumulated VP90 protein of about 40%.

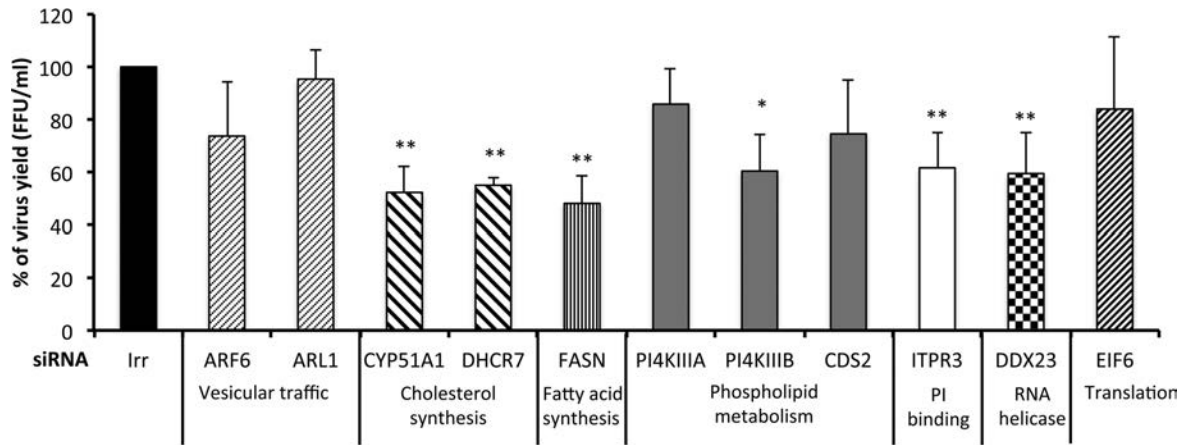
## DISCUSSION

It has been described that (+)RNA viruses replicate in association with membranes, and the membranes that they exploit to generate structures for replication and assembly have been shown to be heterogeneous. Our group previously reported the association of structural and nonstructural astrovirus Yuc8 proteins and both RNAg and RNAag viral RNA species with cell membranes in nucleus-free extracts after density gradient separation in iodixanol (23). Also, a protein corresponding to the carboxy terminus of nsp1a, which has been shown to interact with the viral RNA polymerase, was colocalized with viral RNA and calnexin (42, 43). In this work, we further characterized the association of viral proteins, RNA, and infectious virus with cell membranes using FFZE as an analytical tool.

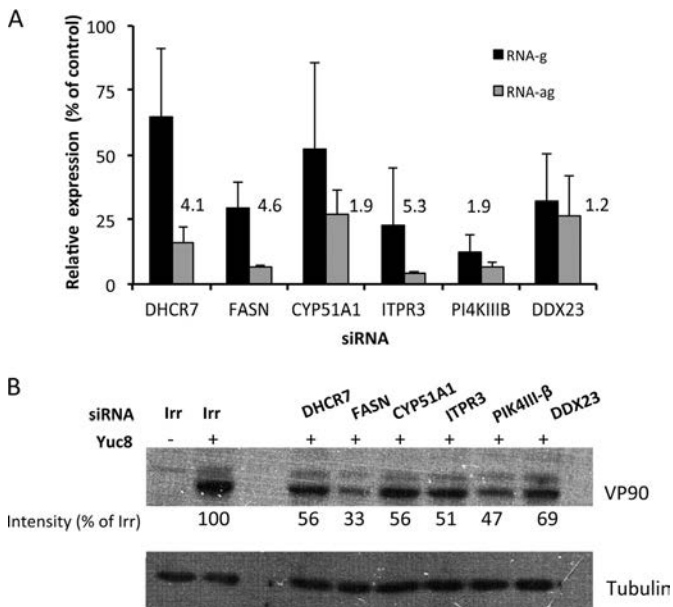
The membranes of astrovirus-infected and mock-infected Caco-2 cells were separated by FFZE into three clearly distinct populations defined by the presence of cellular proteins in the different fractions. Of interest, viral structural and nonstructural proteins, as well as genomic and antigenomic RNA and infectious viral particles, were found exclusively in FFZE membrane population II, predominantly in fractions 44 to 49, suggesting that astrovirus RNA replication and particle assembly occur in association with the same membranes and probably at the same membrane sites, refining previous observations that these processes occur with membranes in general (23). For some (+)RNA viruses, RNA replication and assembly have been described to take place in different membranous compartments (14, 44–46). Depending on the virus, replication might occur on altered membranes derived from the ER (47), Golgi apparatus (48), mitochondria (49), lipid droplets (50), or even lysosomes (51). For instance, the replication of hepatitis C virus (HCV) has been shown to occur in a replication complex bound either to ER membranes that contain nonstructural viral proteins and RNA (47) or to altered

TABLE 3 Proteins in Yuc8-infected cells whose expression was knocked down by RNA interference

Protein full name	Abbreviation	Biological process (GO accession no.)
ADP-ribosylation factor 6	ARF6	Vesicle mediated transport (GO:0016192)
ADP-ribosylation factor-like protein 1	ARL1	(Golgi vesicle transport (GO:0048193)
Lanosterol 14- $\alpha$ demethylase isoform 1	CYP51A1	Cholesterol biosynthetic process (GO:0006695)
Isoform 1 of phosphatidate cytidyltransferase 2	CDS2	Phospholipid metabolic process (GO:0006644)
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	DDX23	Helicase activity (GO:0004386)
7-Dehydrocholesterol reductase	DHCR7	Cholesterol biosynthetic process (GO:0006695)
Eukaryotic translation initiation factor 6	EIF6	Translation (GO:0006412)
Fatty acid synthase	FASN	Fatty acid biosynthetic process (GO:0006633)
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	ITPR3	Phosphatidylinositol binding (GO:0035091)



**FIG 4** Yuc8 viral progeny produced in siRNA-transfected cells. Caco-2 cells transfected with the indicated siRNAs were infected at 72 h posttransfection with astrovirus Yuc8 (MOI, 5). Focus-forming units (FFU) were quantified at 18 h after infection by an immunoperoxidase assay (see Materials and Methods). Irr, irrelevant siRNA (nontargeting; Dharmacon). The biological process in which the knocked-down genes are involved is indicated. The arithmetic means  $\pm$  standard deviations from three independent experiments performed in duplicate are shown. \*\*,  $P < 0.001$ ; \*,  $P < 0.01$ .



**FIG 5** (A) Abundance of genomic and antigenomic viral RNA in silenced cells. The indicated siRNAs were transfected into Caco-2 cells, at 72 h posttransfection the cells were infected with astrovirus Yuc8 (MOI, 5), and the RNA was extracted at 12 hpi. The expression of viral RNA was determined by real-time qRT-PCR as described in Materials and Methods. Results represent the percent expression relative to that in cells transfected with an irrelevant siRNA (nontargeting; Dharmacon). The arithmetic means  $\pm$  standard deviations from three independent experiments performed in duplicate are shown. The numbers represent the ratio of the RNAg concentration/RNAag concentration in the presence of the indicated siRNAs. (B) Effect of siRNAs on the synthesis of the structural polyprotein VP90. The cells were transfected and infected as described above. At 12 hpi, the cell monolayer was solubilized in Laemmli sample buffer and the proteins were analyzed by Western blotting. The structural polyprotein VP90 was detected using anti-Yuc8 serum. Tubulin was used as a loading control. The optical density of the bands was normalized to that of the loading control (tubulin), and the percentage of the VP90 signal of cells transfected with the indicated siRNAs was calculated using the intensity of VP90 from cells transfected with an irrelevant siRNA to be an intensity of 100%. The blots are representative of those from three independent experiments.

membranes derived from different organelles (51), as has also been observed for poliovirus (52). In the case of astrovirus, membrane population II was found to be enriched in membranes from different organelles, including the Golgi apparatus, ER, mitochondria, plasma membrane, and nucleus, suggesting an arrangement similar to that observed for poliovirus. The finding of a large number of nuclear membrane proteins in population II is of interest, and it may reflect the idea that the nuclear envelope is continuous with the ER membrane. Further experiments are needed, however, to define whether RNA replication and particle assembly occur in the same type of membranous structures and whether the astrovirus RNA replication complex is bound to a single type of membrane or to modified membranes derived from different origins.

Electron microscopy and electron tomography analyses have generated significant information about the three-dimensional architecture of the replication factories of RNA(+) viruses (53). The architecture of membrane rearrangement in astrovirus-infected cells is not known; however, ultrastructural analysis of Yuc8-infected Caco-2 cells by electron microscopy and immunoelectron microscopy showed large groups of viral particles surrounding vesicles (O rings) that were not observed in mock-infected cells and that seemed to contain the viral RNA polymerase (23). These vesicles probably correspond to the double-membrane vesicles observed in Caco-2 cells infected with HAstV-4, beside which viral aggregates were observed (43). Additionally, cisterna-like structures surrounding a dark center have been observed in Caco-2 cells infected with Yuc8 (23), and these structures are similar to those found in poliovirus-infected HeLa cells (52). In both cases, viral particles were observed around these horseshoe-like structures. The presence of structural proteins in the membrane of vesicles surrounded by viral particles has also been described for both HAstV-4 and HAstV-8 (23, 43). Even though it would be necessary to directly study the participation of lipid droplets in the rearrangement of membranes induced by astrovirus, the fact that these organelles are considered to originate from the ER (54) suggests their possible participation in the new membranous structures generated during astrovirus replication.

The evidence that FFZE fractions 48 and 49 from population II of infected cells were highly enriched in Yuc8 proteins and viral RNA suggested that these fractions may be important for viral replication. To investigate this further, we selected from these fractions 11 proteins that were either involved in enriched biosynthetic processes (Table 3) or previously reported to be required for the replication of (+)RNA viruses (55–60) to investigate their possible role in astrovirus replication. RNA interference of the genes encoding these 11 proteins showed that knocking down the expression of 6 of them reduced the yield of infectious virus. These findings reveal that the cholesterol synthesis enzymes DHCR7 and CYP51A1, the fatty acid synthase FASN, the phosphatidylinositol kinase PI4KIII $\beta$ , the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ITPR3, and the RNA helicase DDX23 are all required for the efficient replication of the virus in Caco-2 cells. The moderate effect of siRNAs on the reduction of virus yield and genomic and antigenomic viral RNAs that was observed may be explained by the partial knockdown of the expression of the specific genes achieved with the various siRNAs. Alternatively, the existence in some cases of redundant enzymatic activity or the presence of enzyme isoforms not affected by the siRNA employed might also contribute to the partial inhibition effect observed. Finally, the transfection efficiency of the siRNAs is also a factor to consider, since the untransfected, astrovirus-infected cells produced a normal amount of viral progeny.

The requirement of cholesterol and fatty acid synthesis for astrovirus replication is not unprecedented. In fact, other (+)RNA viruses have also been shown to depend on the synthesis of these compounds and to induce extensive ultrastructural changes in infected cells to provide the platforms required to assemble arrays of replication factories (61). For example, HCV infection induces significant changes in the expression of genes involved in the biosynthesis, degradation, and transport of intracellular lipids (62) and alters lipid metabolism (63). In the case of dengue virus, fatty acid biosynthesis was identified to be a cellular pathway required for virus replication (40, 64–66). The replication of dengue virus was also shown to depend on the production of endogenous cholesterol, since the virus nonstructural proteins associate with lipid rafts and cholesterol depletion reduces the rates of Japanese encephalitis virus and dengue virus infection (67, 68). It has also been reported that West Nile virus modulates host cell cholesterol homeostasis by upregulating cholesterol biosynthesis and redistributing cholesterol to viral replication membranes (69). Furthermore, HCV infection increases the abundance and activity of FASN, with a corresponding increase in the production of fatty acids and neutral lipids (70), and dengue virus induces the relocalization of FASN, recruiting it to the virus replication sites (40) in a process mediated by Rab18, which is inserted into the phospholipid monolayer of lipid droplets and is responsible for the trafficking of lipid droplets inside cells (66, 71).

An additional angle of lipid metabolism in virus-infected cells is related to lipid droplets (72). The association of HCV proteins and viral factories with lipid droplets is necessary for the replication and assembly of virus progeny (45, 73, 74), and the replication of dengue virus also depends on these organelles (46). In the case of rotavirus, a dsRNA virus, lipid droplets have been shown to be recruited to viral replication complexes in viroplasm (44). Of interest, the neutral lipids stored in these organelles have been shown to be used to generate the energy likely required for the replication of HCV and rotavirus (63, 75). The involvement of

pathways of fatty acid biosynthesis found in this work suggests that lipid droplets might also work as an energy source for astrovirus replication.

RNA helicases have important roles in viral life cycles, where they are either encoded by the virus genome or recruited from the host. These enzymes are particularly important for RNA viruses since they are involved in replication of the viral genome and in mRNA translation. Despite the length of the astrovirus genome of 6.8 to 7.9 kb, a virus-encoded RNA helicase has not been identified, and it has been speculated that astrovirus uses a cellular enzyme (8). In this regard, it is of interest that a cellular RNA helicase was identified in our proteomic approach. Its precise role in astrovirus replication needs to be determined, but the fact that knockdown of the expression of helicase DDX23 decreases the virus yield, as well as RNA and protein synthesis, indicates that it has a relevant role during the life cycle of the virus. Similar results have been reported for coronaviruses; the nonstructural protein 14 of the coronavirus infectious bronchitis virus interacts with DDX1, a cellular RNA helicase in the DEX(D/H) helicase family. The replication of this virus was decreased by manipulating the expression of DDX1 either by RNA interference or by overexpression of a mutant DDX1 protein (76).

Phosphoinositols (PIs) are phospholipids that mediate signaling cascades in the cell by binding to effector proteins. Reversible phosphorylation of the inositol ring at positions 3, 4, and 5 results in the synthesis of seven different PIs, each of which has a unique subcellular distribution with a predominant localization in subsets of membranes (39). These lipids play a major role in recruiting and regulating the function of proteins at membrane interfaces (77), and the requirement for PI4KIII isoforms  $\alpha$  and  $\beta$  (PI4KIII $\alpha$  and PI4KIII $\beta$ , respectively) for virus replication has been reported. Lim and Hwang (78) showed that PI4KIII $\alpha$  is indispensable for HCV replication, specifically, for the structural integrity of the membranous structures with which the HCV replication complex interacts. In enterovirus, the recruitment of PI4KIII $\beta$  to membranes increases the synthesis of phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) lipids, resulting in a PI4P-enriched membrane microenvironment that enhances the recruitment of the viral RNA-dependent RNA polymerase, which in turn initiates RNA synthesis at these membranes (79). PI4P lipid-enriched membranes have also been proposed to generate high-curvature membrane pockets to protect viral proteins and RNA from host defense (80) and/or to provide binding sites to concentrate viral/host proteins at the membranous web for efficient viral RNA synthesis (39). Further studies are required to determine the mechanism through which PI4KIII $\beta$  contributes to the replication of astrovirus.

The precise step of the astrovirus replication cycle that is favored by the various host factors identified in this work is difficult to determine. Upon infection, the genomic RNA is translated into a nonstructural polyprotein, which, after being processed by viral and cellular proteases, renders the RNA-dependent RNA polymerase and other viral proteins needed to form the viral RNA replication complex. This replication complex, in turn, synthesizes the RNAag using RNAg as the template. The RNAag is then copied by the replication complex into additional RNAg molecules and also serves as a template to synthesize the subgenomic RNA that encodes the virus structural proteins. The observation that the synthesis of RNAag was impaired to a greater extent than that of RNAg (RNAg/RNAag ratio, 1.2 to 5.3) in most of the cases



evaluated in this work suggests that the proteins identified to be required for astrovirus replication are needed directly or indirectly to favor the synthesis of RNA<sub>g</sub>. Further work is needed to define in more detail the stage of the replication cycle that requires the identified proteins, although it is not unreasonable to assume that at least the enzymes involved in lipid metabolism could be required to provide the membranous environment required for an efficient RNA replication process and might also be required in a pathway involved in the production of energy from fatty acid breakdown during virus replication, as has been reported for other viruses.

In summary, the results presented in this study strongly suggest that astrovirus replication and virus assembly take place in association with cell membranes possibly derived from different organelles and exploit cellular lipid metabolism for efficient replication in Caco-2 cells. The mechanism through which the genes found in this work contribute to a successful virus infection is unknown, but their identification provides the basis for further studies that will allow us to deepen our knowledge about the replication of this important pathogen.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grants CB07-79574 (to E.M.) and P-178232 (to R.V.-E.) from CONACyT—Mexico and IN219910 (to E.M.) from DGAPA-UNAM. A.M. was the recipient of a scholarship from CONACyT—Mexico.

#### REFERENCES

- Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, Lewis D, Gray JJ. 2005. Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J Clin Microbiol* 43:3890–3894. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.8.3890-3894.2005>.
- Méndez EA, Arias CF. 2013. Astroviruses, p 609–628. In Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B (ed), *Fields virology*, 6th ed, vol 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Quan PL, Wagner TA, Briese T, Torgerson TR, Hornig M, Tashmukhamedova A, Firth C, Palacios G, Baisre-De-Leon A, Paddock CD, Hutchison SK, Egholm M, Zaki SR, Goldman JE, Ochs HD, Lipkin WI. 2010. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg Infect Dis* 16:918–925. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1606.091536>.
- Blomstrom AL, Widen F, Hammer AS, Belak S, Berg M. 2010. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol* 48:4392–4396. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01040-10>.
- Bouzalas IG, Wuthrich D, Walland J, Drogemuller C, Zurbriggen A, Vandevelde M, Oevermann A, Bruggmann R, Seuberlich T. 2014. Neurotropic astrovirus in cattle with nonsuppurative encephalitis in Europe. *J Clin Microbiol* 52:3318–3324. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01195-14>.
- Fu Y, Pan M, Wang X, Xu Y, Xie X, Knowles NJ, Yang H, Zhang D. 2009. Complete sequence of a duck astrovirus associated with fatal hepatitis in ducklings. *J Gen Virol* 90:1104–1108. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.008599-0>.
- Koci MD, Seal BS, Schultz-Cherry S. 2000. Molecular characterization of an avian astrovirus. *J Virol* 74:6173–6177. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.74.13.6173-6177.2000>.
- Jiang B, Monroe SS, Koonin EV, Stine SE, Glass RI. 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10539–10543. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.22.10539>.
- Monroe SS, Jiang B, Stine SE, Koopmans M, Glass RI. 1993. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *J Virol* 67:3611–3614.
- Ahlquist P, Noueir AO, Lee WM, Kushner DB, Dye BT. 2003. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* 77:8181–8186. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.15.8181-8186.2003>.
- Nagy PD, Pogany J. 2012. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat Rev Microbiol* 10:137–149. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2692>.
- Belov GA, Feng Q, Nikovics K, Jackson CL, Ehrenfeld E. 2008. A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog* 4:e1000216. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000216>.
- Miller S, Krijnse-Locker J. 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* 6:363–374. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1890>.
- Paul D, Madan V, Bartschlagler R. 2014. Hepatitis C virus RNA replication and assembly: living on the fat of the land. *Cell Host Microbe* 16:569–579. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.008>.
- Cherry S, Doukas T, Armknecht S, Whelan S, Wang H, Sarnow P, Perrimon N. 2005. Genome-wide RNAi screen reveals a specific sensitivity of IRES-containing RNA viruses to host translation inhibition. *Genes Dev* 19:445–452. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1267905>.
- Ng TI, Mo H, Pilot-Matias T, He Y, Koev G, Krishnan P, Mondal R, Pithawalla R, He W, Dekhtyar T, Packer J, Schurdak M, Molla A. 2007. Identification of host genes involved in hepatitis C virus replication by small interfering RNA technology. *Hepatology* 45:1413–1421. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.21608>.
- Vashist S, Urena L, Chaudhry Y, Goodfellow I. 2012. Identification of RNA-protein interaction networks involved in the norovirus life cycle. *J Virol* 86:11977–11990. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00432-12>.
- Le Breton M, Meyniel-Schicklin L, Deloire A, Coutard B, Canard B, de Lamballerie X, Andre P, Rabourdin-Combe C, Lotteau V, Davoust N. 2011. Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. *BMC Microbiol* 11:234. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-234>.
- Mairiang D, Zhang H, Sodja A, Murali T, Suriyaphol P, Malasit P, Limjindaporn T, Finley RL, Jr. 2013. Identification of new protein interactions between dengue fever virus and its hosts, human and mosquito. *PLoS One* 8:e53535. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0053535>.
- Kopeck BG, Perkins G, Miller DJ, Ellisman MH, Ahlquist P. 2007. Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biol* 5:e220. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0050220>.
- Kujala P, Ikaheimonen A, Ehsani N, Vihinen H, Auvinen P, Kaariainen L. 2001. Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *J Virol* 75:3873–3884. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.8.3873-3884.2001>.
- Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartschlagler R. 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5:365–375. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>.
- Mendez E, Aguirre-Crespo G, Zavala G, Arias CF. 2007. Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. *J Virol* 81:10649–10658. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00785-07>.
- Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O. 2007. Enhanced separation of membranes during free flow zonal electrophoresis in plants. *Anal Chem* 79:5181–5187. <http://dx.doi.org/10.1021/ac070159v>.
- Hannig K. 1982. New aspects in preparative and analytical continuous free-flow cell electrophoresis. *Electrophoresis* 3:235–243. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.1150030502>.
- Mendez E, Fernandez-Luna T, Lopez S, Mendez-Toss M, Arias CF. 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J Virol* 76:7996–8002. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.16.7996-8002.2002>.
- Mendez E, Salas-Ocampo E, Arias CF. 2004. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J Virol* 78:8601–8608. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.16.8601-8608.2004>.
- Mendez E, Salas-Ocampo MP, Munguia ME, Arias CF. 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *J Virol* 77:11378–11384. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.21.11378-11384.2003>.
- Arias CF, Romero P, Alvarez V, Lopez S. 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol* 70:5832–5839.
- Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O. 2012. Protein profiling of epider-

- mal bladder cells from the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Proteomics* 12:2862–2865. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201200152>.
31. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74:5383–5392. <http://dx.doi.org/10.1021/ac025747h>.
  32. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 75:4646–4658. <http://dx.doi.org/10.1021/ac0341261>.
  33. von Mering C, Huynen M, Jaeggi D, Schmidt S, Bork P, Snel B. 2003. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res* 31:258–261. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg034>.
  34. Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, Christmas R, Avila-Campilo I, Creech M, Gross B, Hanspers K, Isserlin R, Kelley R, Killcoyne S, Lotia S, Maere S, Morris J, Ono K, Pavlovic V, Pico AR, Vailaya A, Wang PL, Adler A, Conklin BR, Hood L, Kuiper M, Sander C, Schmulevich I, Schwikowski B, Warner GJ, Ideker T, Bader GD. 2007. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc* 2:2366–2382. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.324>.
  35. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman WH, Pages F, Trajanoski Z, Galon J. 2009. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25:1091–1093. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>.
  36. Belliot G, Laveran H, Monroe SS. 1997. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch Virol* 142:1323–1334. <http://dx.doi.org/10.1007/s007050050163>.
  37. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. *Methods* 25:402–408. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
  38. Heaton NS, Randall G. 2011. Multifaceted roles for lipids in viral infection. *Trends Microbiol* 19:368–375. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.03.007>.
  39. Delang L, Paeshuyse J, Neyts J. 2012. The role of phosphatidylinositol 4-kinases and phosphatidylinositol 4-phosphate during viral replication. *Biochem Pharmacol* 84:1400–1408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.07.034>.
  40. Heaton NS, Perera R, Berger KL, Khadka S, Lacount DJ, Kuhn RJ, Randall G. 2010. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:17345–17350. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1010811107>.
  41. Rodgers MA, Villareal VA, Schaefer EA, Peng LF, Corey KE, Chung RT, Yang PL. 2012. Lipid metabolite profiling identifies desmosterol metabolism as a new antiviral target for hepatitis C virus. *J Am Chem Soc* 134:6896–6899. <http://dx.doi.org/10.1021/ja207391q>.
  42. Fuentes C, Guix S, Bosch A, Pinto RM. 2011. The C-terminal nsP1a protein of human astrovirus is a phosphoprotein that interacts with the viral polymerase. *J Virol* 85:4470–4479. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01515-10>.
  43. Guix S, Caballero S, Bosch A, Pinto RM. 2004. C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA. *J Virol* 78:13627–13636. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.24.13627-13636.2004>.
  44. Cheung W, Gill M, Esposito A, Kaminski CF, Courousse N, Chwetzoff S, Trugnan G, Keshavan N, Lever A, Desselberger U. 2010. 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* 84:6782–6798. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01757-09>.
  45. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9:1089–1097. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1631>.
  46. Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assuncao-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, Bozza PT, Gamarnik AV. 2009. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* 5:e1000632. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000632>.
  47. El-Hage N, Luo G. 2003. Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *J Gen Virol* 84:2761–2769. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.19305-0>.
  48. Roulin PS, Lotzerich M, Torta F, Tanner LB, van Kuppeveld FJ, Wenk MR, Greber UF. 2014. Rhinovirus uses a phosphatidylinositol 4-phosphate/cholesterol counter-current for the formation of replication compartments at the ER-Golgi interface. *Cell Host Microbe* 16:677–690. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.003>.
  49. Miller DJ, Schwartz MD, Ahlquist P. 2001. Flock house virus RNA replicates on outer mitochondrial membranes in *Drosophila* cells. *J Virol* 75:11664–11676. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.23.11664-11676.2001>.
  50. Gaunt ER, Cheung W, Richards JE, Lever A, Desselberger U. 2013. Inhibition of rotavirus replication by downregulation of fatty acid synthesis. *J Gen Virol* 94:1310–1317. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.050146-0>.
  51. Berger KL, Randall G. 2009. Potential roles for cellular cofactors in hepatitis C virus replication complex formation. *Commun Integr Biol* 2:471–473. <http://dx.doi.org/10.4161/cib.2.6.9261>.
  52. Schlegel A, Giddings TH, Jr, Ladinsky MS, Kirkegaard K. 1996. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* 70:6576–6588.
  53. Paul D, Bartenschlager R. 2013. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol* 2:32–48. <http://dx.doi.org/10.5501/wjv.v2.i2.32>.
  54. Thiam AR, Farese RV, Jr, Walther TC. 2013. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:775–786. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3699>.
  55. Berger KL, Cooper JD, Heaton NS, Yoon R, Oakland TE, Jordan TX, Mateu G, Grakoui A, Randall G. 2009. Roles for endocytic trafficking and phosphatidylinositol 4-kinase III alpha in hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7577–7582. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0902693106>.
  56. Ehrlich LS, Medina GN, Khan MB, Powell MD, Mikoshiba K, Carter CA. 2010. Activation of the inositol (1,4,5)-triphosphate calcium gate receptor is required for HIV-1 Gag release. *J Virol* 84:6438–6451. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01588-09>.
  57. Lu L, Horstmann H, Ng C, Hong W. 2001. Regulation of Golgi structure and function by ARF-like protein 1 (Arl1). *J Cell Sci* 114:4543–4555.
  58. Sasaki J, Ishikawa K, Arita M, Taniguchi K. 2012. ACBD3-mediated recruitment of PI4KB to picornavirus RNA replication sites. *EMBO J* 31:754–766. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.429>.
  59. Sharma M, Sasvari Z, Nagy PD. 2010. Inhibition of sterol biosynthesis reduces tombusvirus replication in yeast and plants. *J Virol* 84:2270–2281. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02003-09>.
  60. Sharma M, Sasvari Z, Nagy PD. 2011. Inhibition of phospholipid biosynthesis decreases the activity of the tombusvirus replicase and alters the subcellular localization of replication proteins. *Virology* 415:141–152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2011.04.008>.
  61. Perera R, Riley C, Isaac G, Hopf-Jannasch AS, Moore RJ, Weitz KW, Pasa-Tolic L, Metz TO, Adamec J, Kuhn RJ. 2012. Dengue virus infection perturbs lipid homeostasis in infected mosquito cells. *PLoS Pathog* 8:e1002584. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002584>.
  62. Blackham S, Baillie A, Al-Hababi F, Remlinger K, You S, Hamatake R, McGarvey MJ. 2010. Gene expression profiling indicates the roles of host oxidative stress, apoptosis, lipid metabolism, and intracellular transport genes in the replication of hepatitis C virus. *J Virol* 84:5404–5414. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02529-09>.
  63. Liefhebber JM, Hague CV, Zhang Q, Wakelam MJ, McLauchlan J. 2014. Modulation of triglyceride and cholesterol ester synthesis impairs assembly of infectious hepatitis C virus. *J Biol Chem* 289:21276–21288. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.582999>.
  64. Carvalho FA, Carneiro FA, Martins IC, Assuncao-Miranda I, Faustino AF, Pereira RM, Bozza PT, Castanho MA, Mohana-Borges R, Da Poian AT, Santos NC. 2012. Dengue virus capsid protein binding to hepatic lipid droplets (LD) is potassium ion dependent and is mediated by LD surface proteins. *J Virol* 86:2096–2108. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.06796-11>.
  65. Martins IC, Gomes-Neto F, Faustino AF, Carvalho FA, Carneiro FA, Bozza PT, Mohana-Borges R, Castanho MA, Almeida FC, Santos NC, Da Poian AT. 2012. The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif. *Biochem J* 444:405–415. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20112219>.
  66. Tang WC, Lin RJ, Liao CL, Lin YL. 2014. Rab18 facilitates dengue virus infection by targeting fatty acid synthase to sites of viral replication. *J Virol* 88:6793–6804. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00045-14>.

67. Lee CJ, Lin HR, Liao CL, Lin YL. 2008. Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *J Virol* 82:6470–6480. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00117-08>.
68. Rothwell C, Lebreton A, Young Ng C, Lim JY, Liu W, Vasudevan S, Labow M, Gu F, Gaither LA. 2009. Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Virology* 389:8–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.025>.
69. Mackenzie JM, Khromykh AA, Parton RG. 2007. Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host Microbe* 2:229–239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2007.09.003>.
70. Nasheri N, Joyce M, Rouleau Y, Yang P, Yao S, Tyrrell DL, Pezacki JP. 2013. Modulation of fatty acid synthase enzyme activity and expression during hepatitis C virus replication. *Chem Biol* 20:570–582. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.03.014>.
71. Rasineni K, McVicker BL, Tuma DJ, McNiven MA, Casey CA. 2014. Rab GTPases associate with isolated lipid droplets (LDs) and show altered content after ethanol administration: potential role in alcohol-impaired LD metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 38:327–335. <http://dx.doi.org/10.1111/acer.12271>.
72. Herker E, Ott M. 2012. Emerging role of lipid droplets in host/pathogen interactions. *J Biol Chem* 287:2280–2287. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R111.300202>.
73. Filipe A, McLauchlan J. 2015. Hepatitis C virus and lipid droplets: finding a niche. *Trends Mol Med* 21:34–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.003>.
74. Hope RG, Murphy DJ, McLauchlan J. 2002. The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J Biol Chem* 277:4261–4270. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M108798200>.
75. Crawford SE, Utama B, Hyser JM, Broughman JR, Estes MK. 2013. Rotavirus exploits lipid metabolism and energy production for replication, p 74. *Abstr Annu Meet Am Soc Virol*, Penn State University, University Park, PA.
76. Xu L, Khadijah S, Fang S, Wang L, Tay FP, Liu DX. 2010. The cellular RNA helicase DDX1 interacts with coronavirus nonstructural protein 14 and enhances viral replication. *J Virol* 84:8571–8583. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00392-10>.
77. Di Paolo G, De Camilli P. 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443:651–657. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05185>.
78. Lim YS, Hwang SB. 2011. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with phosphatidylinositol 4-kinase type IIIalpha and regulates viral propagation. *J Biol Chem* 286:11290–11298. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.194472>.
79. Hsu NY, Ilnytska O, Belov G, Santiana M, Chen YH, Takvorian PM, Pau C, van der Schaar H, Kaushik-Basu N, Balla T, Cameron CE, Ehrenfeld E, van Kuppeveld FJ, Altan-Bonnet N. 2010. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* 141:799–811. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.050>.
80. Stapleford KA, Miller DJ. 2010. Role of cellular lipids in positive-sense RNA virus replication complex assembly and function. *Viruses* 2:1055–1068. <http://dx.doi.org/10.3390/v2051055>.