



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Papel del sistema ubiquitina-proteasoma en el ciclo replicativo de astrovirus
VA1**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

MVZ Luis Eduardo Jiménez Martínez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Tomás David López Díaz
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Juan Ernesto Ludert León
CINVESTAV

Dra. Wendy Xolalpa Villanueva
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2021



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 se realizó en el Laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Tomás David López Díaz y contó con el apoyo del donativo de la DGAPA IN210120. El alumno Luis Eduardo Jiménez Martínez recibió una beca CONACYT con número 1002780 para realizar sus estudios de maestría.

Jurado designado para el examen de grado:

Dr. José Luis Puente García, PRESIDENTE

Dra. Ana Carolina Alcalá, SECRETARIO

Dra. Isabel Gómez Gómez, VOCAL

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, VOCAL

Dr. Ramón Antonio González García Conde, VOCAL

Agradecimientos técnicos

El autor del presente trabajo agradece el apoyo técnico proporcionado por la Q.B.P. Rafaela Espinosa durante el desarrollo del presente trabajo.

Agradecimientos

A mis padres y hermanos, por su amor y apoyo incondicional.

A Vi, por todo lo que compartimos.

Al Doctor Tomás López, por sus enseñanzas y paciencia.

A los miembros de GAL, por todo lo brindado.

Índice

Índice de figuras	1
Índice de tablas	2
Abreviaturas.....	3
Resumen	5
1. Introducción	6
1.1 Epidemiología de los astrovirus humanos clásicos y nuevos	8
1.1.1 Patogénesis y enfermedad	8
1.1.2 Rutas de transmisión	10
1.1.3 Prevalencia de los Astrovirus clásicos	11
1.1.4 Prevalencia de los nuevos Astrovirus	12
1.2 Generalidades Astrovirus	12
1.3 Organización genómica	12
1.4 Ciclo replicativo	13
1.5 Sistema Ubiquitina-proteasoma	16
1.5.1 Ubiquitinación	16
1.5.2 Desubiquitinasas	17
1.5.3 Proteasoma	17
1.5.3.1 Partícula núcleo	18
1.5.3.2 Activadores del proteasoma	19
1.5.4 Inhibidores del proteasoma.....	21
1.5.4.1 Clases químicas de los inhibidores del proteasoma	21
1.6 Sistema Ubiquitina-Proteasoma en infecciones virales	23
1.6.1 Degradación de proteínas celulares por el SUP durante la infección viral	24
1.6.2 Degradación de proteínas virales por el SUP	25
2. Antecedentes	27
3. Justificación	30
4. Hipótesis.....	31
5. Objetivo General	31
5.1 Objetivos específicos	31

6. Material y métodos	32
6.1 Células, virus y reactivos	32
6.2 Anticuerpos	32
6.3 Ensayos de infección con los inhibidores del proteasoma	32
6.4 Determinación del título de virus infeccioso	33
6.5 Western Blot	33
6.6 Medición de la viabilidad celular	34
6.7 Inmunofluorescencia	34
6.8 Análisis estadístico de los datos	35
7. Resultados	36
7.1 Los inhibidores del proteasoma reducen la producción de progenie viral y la expresión de la proteína de cápside de manera dependiente de la dosis	36
7.2 La inhibición del proteasoma durante las primeras 24 horas del ciclo viral reduce la replicación del virus	37
7.3 Inhibir el proteosoma con MG132 y bortezomib durante la infección reduce la producción de proteínas no estructurales.	40
7.4 La expresión de proteínas virales se observa a partir de las 12 horas y requiere de un proteasoma activo para su expresión y procesamiento	42
7.5 Las primeras 12 horas del ciclo replicativo de VA1 requieren de un proteasoma funcional ...	44
7.6 La inhibición del proteasoma reduce la infectividad del VA1	45
8. Discusión	48
9. Conclusiones	52
10. Perspectivas	52
11. Referencias	53

Índice de figuras

Figura 1. Relaciones filogenéticas dentro de la familia <i>Astroviridae</i>	7
Figura 2. Organización del genoma de Astrovirus	13
Figura 3. Ciclo replicativo de los Astrovirus clásicos.....	15
Figura 4. Estructura y función del proteosoma	20
Figura 5. Evaluación de la progenie y de las proteínas estructurales de astrovirus VA1 durante 72 horas.....	28
Figura 6. Efecto de los inhibidores del proteosoma sobre la producción de progenie y proteínas estructurales de VA1	37
Figura 7. Esquema del experimento de infección utilizando las drogas por intervalos de 24 horas	38
Figura 8. Los inhibidores del proteosoma reducen la replicación viral	39
Figura 9. Efecto de MG132 y bortezomib sobre la producción de partículas de VA1 y de las proteínas estructurales y no estructurales	41
Figura 10. Esquema de la cinética de infección utilizando las drogas por intervalos de 12 horas durante 48 horas	43
Figura 11. El proteosoma es necesario durante las primeras 24 horas del ciclo viral.....	43
Figura 12. Esquema de la cinética de infección utilizando las drogas por intervalos de 6 horas durante 24 horas.....	44
Figura 13. La importancia del proteosoma es mayor durante las primeras 12 horas del ciclo.....	45
Figura 14. Esquema de los 3 tratamientos con bortezomib.....	46
Figura 15. La inhibición del proteosoma durante las primeras 6 horas del ciclo viral afecta la infectividad del virus.....	47

Índice de tablas

Tabla 1. Especies de astrovirus que infectan a los humanos y sus diferentes serotipos/clados.....6

Tabla 2. Resumen de los 11 reportes de casos de infecciones severas del sistema nervioso central en humanos por HAstV.....10

Abreviaturas

μ l	Microlitros
μ M	Micromolar
agRNA	RNA antigenómico
AMP	Adenosin monofosfato
ATP	Adenosin trifosfato
BHK21	Línea celular de riñón de hámster bebé
°C	Grados centígrados
CaCo-2	línea celular de carcinoma de colon
CO ₂	Dióxido de carbono
CTD	Dominio carboxilo terminal
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA de doble cadena
gRNA	RNA genómico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HAstV	Astrovirus humanos clásicos
HMO	Humano-Mink-Ovino
I κ B α	Factor nuclear del potenciador del gen del polipéptido kappa ligero en el inhibidor de células B, alfa
IFN I	Interferón de tipo I
IRF3	Factor de transcripción regulador de interferón 3
kDa	Kilo Daltones
LDH	Lactato deshidrogenasa
mA	miliAmperios
MAVS	Proteína de señalización antiviral mitocondrial

MHC I	Complejo principal de histocompatibilidad de tipo I
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
N	Normal
NF- κ B	Factor Nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células beta activadas
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
ORF	Marco de lectura abierto
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución Salina tamponada con fosfato
Rab5	Proteína relacionada con Ras, 5
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa retro transcriptasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
sgRNA	RNA subgenómico
siRNA	RNA pequeño interferente
STAT	Transductor de señales y activador de proteínas de transcripción
TRIM25	Proteína que contiene un motivo tripartido, 25
VP 70/90	Proteína viral 70/90
VPg	Proteína viral ligada al genoma

Resumen

Los astrovirus son una de las causas principales de gastroenteritis viral en individuos jóvenes, de la tercera edad, y en personas inmunocomprometidas. Además, han sido asociados recientemente con infecciones del sistema nervioso central tanto en humanos como en animales, siendo el astrovirus VA1 la especie más frecuente en este tipo de infecciones.

Los virus han evolucionado para interrumpir funciones específicas de la célula y manipularlas para favorecer su replicación. El sistema ubiquitina proteasoma (UPS) es la principal vía de degradación proteica de la célula, está involucrado en diferentes procesos como la degradación de proteínas, presentación de antígenos, regulación del ciclo celular, apoptosis, mitofagia, respuesta inmune innata, entre otros. Debido a la importancia de este sistema, se ha demostrado que muchos virus dependen del mismo durante una o varias etapas del ciclo replicativo. Anteriormente se determinó que este sistema es necesario durante la replicación del astrovirus humano serotipo 8 (HAstV-8), siendo requerido principalmente durante la producción de los RNA virales de polaridad positiva.

Para determinar si el proteasoma es necesario durante el ciclo replicativo del astrovirus VA1, utilizamos las drogas inhibidoras del proteasoma, MG132 y bortezomib, por periodos de 24 horas durante 48 horas, teniendo una disminución del título viral de aproximadamente 4 y 2 logaritmos al utilizar las dosis más altas de MG132 y bortezomib, respectivamente. Para conocer en qué punto del ciclo es requerido el proteasoma, se trataron las células con ambas drogas a diferentes tiempos de infección, observando que la inhibición del proteasoma durante las primeras 12 horas del ciclo afectó en mayor grado la replicación viral. Por último, debido a que el proteasoma es necesario durante un tiempo temprano, la entrada podría ser uno de los eventos que requiera de un proteasoma activo. Para explorar esto, las células se trataron con bortezomib durante y después del tiempo putativo de entrada, observando una disminución del 74% en el primer caso y del 37% cuando las células fueron tratadas después de la hora putativa de entrada.

Los resultados de este proyecto permiten concluir que el proteasoma es necesario para el ciclo replicativo del astrovirus VA1, que el evento que requiere en mayor grado de un proteasoma activo se encuentra dentro de las primeras horas del ciclo y que la entrada del virus podría ser uno de estos eventos tempranos.

1. Introducción

Los miembros de la familia *Astroviridae* son virus no envueltos con genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva, frecuentemente son detectados en muestras de heces de vertebrados (1). Esta familia cuenta con dos géneros, los astrovirus que infectan a las aves, contenidos dentro del género *Avastrovirus* y los astrovirus que infectan mamíferos, en el género *Mamastrovirus*. Las infecciones por astrovirus en las aves generan diversas patologías incluyendo enteritis, hepatitis, nefritis y gota (2,3). Las infecciones por astrovirus en mamíferos típicamente causan gastroenteritis y en algunos casos generan síndromes neurológicos (2). Dentro de este último género, se encuentran los astrovirus que infectan a los humanos, incluyendo a los clásicos y los no clásicos. Los astrovirus humanos clásicos han sido clasificados en 8 serotipos diferentes (HAstV-1 a HAstV-8), este grupo define a la especie *Mamastrovirus 1* dentro del género *Mamastrovirus* (4). Los astrovirus humanos no clásicos o nuevos incluyen a las especies *Mamastrovirus 6*, que incluye los tipos MLB1, MLB2 y MLB3; *Mamastrovirus 8* representada por VA2/HMO-A y VA4; y *Mamastrovirus 9* que contiene a VA1/HMO-C y VA3/HMO-A (2). La clasificación de las especies de astrovirus que infectan a los humanos y sus diferentes serotipos se muestran en la tabla 1, mientras que las relaciones filogenéticas dentro de la familia *Astroviridae* se observan en la figura 1.

Tabla 1. Especies de astrovirus que infectan a los humanos y sus diferentes serotipos/clados.

Especies que infectan humanos dentro del género <i>Mamastrovirus</i>	Serotipos/Clados
Astrovirus clásicos	
<i>Mamastrovirus 1</i>	HAstV 1-8
Astrovirus no clásicos	
<i>Mamastrovirus 6</i> (MLB)	MLB1, MLB 2 y MLB3
<i>Mamastrovirus 8</i> (VA2-VA4)	VA2 (HMO-A) y VA4
<i>Mamastrovirus 9</i> (VA1-VA3)	VA1 (HMO-C) y VA3 (HMO-B)
No asignado (VA5)	VA5

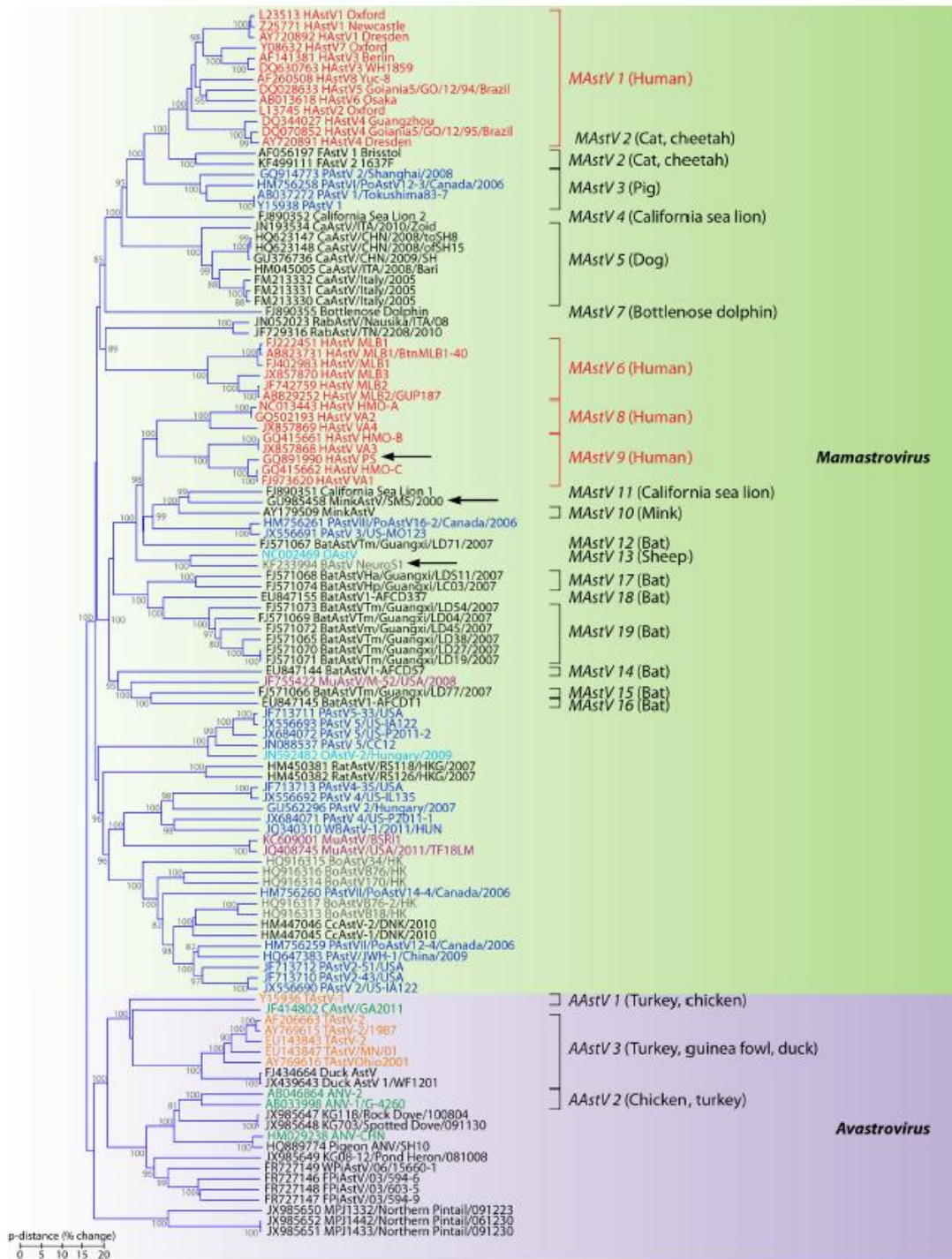


Figura 1. Relaciones Filogenéticas dentro de la familia *Astroviridae*. Los virus de humanos están resaltados en rojo, los porcinos en azul oscuro, los de mink en gris, los de bovinos en café, los de ovino en azul claro, los de murciélago en negro, los murinos en morado, los de pavo en naranja y los de pollo en verde. Las flechas indican las cepas que han sido aisladas de tejidos neurológicos. HastV, astrovirus humanos; FAstV, astrovirus felino; PAstV, astrovirus porcino; CaAstV, astrovirus canino; RabAstV, astrovirus de conejo; OAstV, astrovirus ovino; BoAstV, astrovirus bovino; MuAstV, astrovirus murino; WBastV, astrovirus de jabalí; CcAstV, astrovirus de venado; TAstV, astrovirus de pavo; CAstV, astrovirus de pollo. Tomada de Bosch *et al.*, 2014 (1).

1.1 Epidemiología de los astrovirus humanos clásicos y nuevos

Desde su descubrimiento en 1975 en muestras de heces de niños con diarrea (5), los HAstV han sido agentes etiológicos de gastroenteritis virales bien establecidos con una distribución mundial (1). Aunque se han reportado en casos de gastroenteritis en adultos inmunocompetentes, se consideran predominantemente como una causa común de gastroenteritis viral en la población pediátrica, después de los rotavirus y norovirus (7). Además de los niños, otros grupos vulnerables a las gastroenteritis por astrovirus son los adultos mayores (8) y los individuos inmunocomprometidos (4).

Desde 2008, dos nuevos grupos de astrovirus altamente divergentes, llamados MLB (Melbourne) y VA/HMO (Virginia/Human-Mink-Ovine), han sido identificados en muestras de heces de individuos con diarrea usando secuenciación de nueva generación (9–14).

Los astrovirus clásicos, pero especialmente los nuevos, han sido identificados recientemente como la causa de infecciones del sistema nervioso central (SNC), resaltando que estos virus pueden escapar del tracto gastrointestinal e infectar otros tejidos y órganos (15).

1.1.1 Patogénesis y enfermedad

Los HAstV infectan principalmente al sistema digestivo, siendo los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado el principal tipo celular infectado por los astrovirus clásicos. Por su parte, astrovirus VA1 tiene tropismo por varios tipos celulares, como se observó en un estudio en el que se infectaron enteroides intestinales humanos con este virus, y se identificaron como células blanco: las células progenitoras, los enterocitos absorbentes y probablemente las células caliciformes (16). Las células caliciformes son la célula blanco del astrovirus murino, como se ha visto en un estudio donde se utilizó un modelo de infección *in vivo* (17).

Los astrovirus son una causa frecuente de gastroenteritis leve en niños menores de cinco años, donde usualmente generan una enfermedad autolimitante que consiste en una diarrea acuosa con una duración de dos a tres días. Se ha visto que la partícula viral de los astrovirus humano y del pavo actúan como una enterotoxina e inducen la disrupción de la barrera epitelial intestinal, de acuerdo con modelos *in vitro* y animales, respectivamente (18,19). El vómito es menos prevalente en la infección por astrovirus que en la infección por rotavirus o norovirus, y el período de incubación es un poco más largo (2).

El vínculo causal entre los nuevos astrovirus y la gastroenteritis aguda ha sido investigado en estudios de casos y controles, con resultados inconsistentes. Mientras que Holtz et al. no encontraron ninguna asociación entre MLB1 y diarrea en una cohorte de niños en India (20), Meyers et al. reportaron una asociación para MLB1, pero no para MLB2, VA1, y VA2 en Kenia y Gambia, además de una mayor prevalencia de MLB3 en los sujetos control (21). Por su parte, Vu et al. demostraron que en España las frecuencias con que los astrovirus

MLB y VA son identificados en niños mayores de 5 años asintomáticos y sintomáticos son similares (22). Por otro lado, el hecho de que los astrovirus pueden ser recuperados de las heces de niños asintomáticos (21,23,24) y mamíferos (25) genera la duda de si esto simplemente refleja la excreción prolongada de astrovirus, o si los viriones de astrovirus pueden persistir de alguna manera en el tracto gastrointestinal, y ser parte del viroma del intestino.

Además de la gastroenteritis clásicamente vista en niños y en adultos mayores, los HAsTV han sido asociados recientemente con encefalitis y meningitis en pacientes inmunocomprometidos (15); particularmente el genotipo VA1/HMO-C ha sido identificado en seis de los once casos de encefalitis que se han reportado desde el 2007 (26–30), viéndose involucrados también el grupo MLB (31,32) y los astrovirus clásicos (33,34). La tabla 2 resume estos once casos de infección del SNC en humanos. Sólo dos de estos casos afectaron a personas inmunocompetentes, uno de estos fue una mujer adulta, la cual se recuperó de una infección por MLB2 autolimitada, el otro caso fue una niña de 16 meses de edad que también se recuperó de la infección del encéfalo por HAsTV-1. De los otros casos, seis fueron mortales. La carga viral en biopsias de cerebro puede ser hasta de 1.5×10^7 moléculas de RNA por reacción (29). En algunas ocasiones 10^3 veces más alta que en el fluido cerebroespinal, y 10^6 veces más alto que en las heces (29). Estos resultados sugieren que los análisis de muestras que provienen del fluido cerebroespinal o las heces pueden ser insuficientes y que el análisis de especímenes profundos (biopsias de cerebro) podría ser requerido para hacer un diagnóstico.

En animales, los astrovirus también han sido asociados con infección del SNC, causando encefalitis supurativa en bovinos (35), encefalitis y ganglionitis en ovinos (36), síndrome del mink tembloroso (37), y ha sido asociado con el síndrome del tembor congénito en lechones (38).

Adicionalmente, se ha identificado astrovirus MLB2 y VA1 en muestras de plasma e hisopados nasofaríngeos de niños con fiebre y enfermedad respiratoria aguda de etiología desconocida (32,39,40).

Tabla 2. Resumen de los 11 reportes de casos de infecciones severas del sistema nervioso central en humanos por HAstV (Tomada y modificada de Vu *et al*, 2017 (2)).

Tipo de HAstV nuevo	Año	País	Edad del paciente	Condición subyacente	Tipo de infección del SNC/Presentación	Tratamiento	Desenlace	Referencia
Mamastrovirus 1								
HAstV-4	2008	Suiza	3 meses	HSCT por inmunodeficiencia combinada severa	Meningoencefalitis	Ninguno	Muerto	(34)
HAstV-1	2019	Alemania	16 meses	Sano	Encefalitis	Ninguno	Vivo	(33)
Mamastrovirus 6								
MLB1	2015	Japón	4 años	CB HSCT por anemia aplásica congénita Enfermedad GvH	Encefalitis	Aciclovir IVIG Edaravona	Vivo	(31)
MLB2	2014	Suiza	21 años	Sano	Meningitis aguda	Ceftriaxona Aciclovir	Vivo	(32)
MLB2	2014	Suiza	37 años	HSCT por leucemia mieloide aguda	Meningitis	Ninguno	Muerto	(32)
Mamastrovirus 9								
VA1	2007	Estados Unidos	15 años	Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X	Dolor de cabeza, pensamientos homicidas y suicidas, pérdida de memoria, ataxia, deterioro cognitivo progresivo	Ninguno	Muerto	(26)
VA1	2013	Reino Unido	42 años	HSCT por leucemia linfocítica crónica	Sordera sensorineural progresiva Encefalitis	Valaciclovir Antibióticos BS Esteroides IVIG Ribavirina	Muerto	(27)
VA1	2014	Francia	14 años	Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X	Historia de 4 años de discapacidad cognitiva progresiva, ataxia y convulsiones	IVIG Esteroides Ribavirina PEG IFN-alfa 2b	Vivo	(28)
VA1	2015	Reino Unido	18 meses	HSCT por hipoplasia de cartilago-cabello	Encefalitis	Cidofovir DLI-específico de Adenovirus	Muerto	(29)
VA1	2015	Reino Unido	8 meses	HSCT por leucemia mieloide aguda GvH grado 1	Encefalitis	DLI	Muerto	(41)
VA1	2021	Suecia	15 años	HCT por leucemia mieloide aguda	Encefalitis aguda	Busulfán, fludarabina y seroterapia	Vivo	(30)

CB: Sangre de cordón umbilical; HSCT: Trasplante de células troncales hematopoyéticas; GvH: Enfermedad de Graft contra el huésped; BS: Amplio espectro; IVIG: Inmunoglobulina intravenosa; DLI: Infusión de linfocitos donados; HCT: Trasplante allogénico de células hematopoyéticas.

1.1.2 Rutas de transmisión

Los astrovirus clásicos son transmitidos esencialmente por la vía fecal-oral, como ha sido demostrado por voluntarios humanos (42,43). Los HAstV también han demostrado ser lo

suficientemente estables en el ambiente para llevar a cabo la transmisión mediada por la ingesta de agua potable o de mar (1,44). Pueden ser encontrados en las aguas residuales (45) y como otros patógenos virales, no son completamente removidos después del tratamiento de éstas (46). Los HAstV nuevos también han sido detectados en las aguas residuales, aunque su prevalencia es menor que la de los HAstV clásicos (47), lo cual puede reflejar un menor número de individuos infectados, una menor excreción viral, o métodos de detección menos sensibles. Independientemente de cuál sea el caso, los HAstV nuevos y clásicos son descargados en los ambientes de aguas marinas y potables (48,49).

De manera infrecuente, los HAstV han sido implicados en grandes brotes de gastroenteritis transmitidas por alimentos (2). Un manejo inadecuado de los alimentos conduce a la contaminación de productos de comida rápida que son consumidos con un pobre, o ningún, proceso de cocción (50,51), y en las enfermedades transmitidas por alimentos causadas por cualquier virus, las personas asintomáticas que manejan alimentos son la fuente más frecuente de brotes (52).

En hospitales, guarderías o centros geriátricos, los fómites tienen un papel importante en la transmisión mediada por vehículos de los HAstV (53,54), los cuales pueden permanecer secos en superficies inanimadas el tiempo suficiente y con la carga viral necesaria para representar una amenaza importante a la salud para huéspedes vulnerables (55). Los HAstV clásicos pueden sobrevivir por al menos dos días a temperatura ambiente en materiales no porosos, como inodoros, y por al menos una semana en materiales porosos, como el papel de baño o la ropa de cama (55).

1.1.3 Prevalencia de los Astrovirus clásicos

Los HAstV clásicos son ubicuos pero su presencia es notablemente mayor en países en desarrollo. La prevalencia entre niños con gastroenteritis, en estudios en los cuales se utiliza RT-qPCR como método de detección, es de aproximadamente el 5% en países en vías de desarrollo (2).

Con respecto a la incidencia de diferentes serotipos, HAstV-1 es el tipo más prevalente alrededor del mundo, contabilizando más del 50% de los casos en todos los reportes recientes (2), mientras que el segundo serotipo más frecuente depende de la localización geográfica.

Con el drástico incremento en la sensibilidad de la RT-qPCR, una tasa significativamente más alta de casos positivos de HAstV entre niños asintomáticos ha sido reportada (56–58), siendo de aproximadamente el 4%, pero alcanzando a ser superior al 20% en algunos estudios (23).

Las infecciones conjuntas de HAstV con otros virus entéricos son reportadas frecuentemente, y existen datos indicando una correlación significativa entre infecciones conjuntas y enfermedad clínica (56). La tasa promedio de infecciones conjuntas de HAstV,

especialmente con virus entéricos, es mayor del 30%, generando que las asociaciones con gastroenteritis se hagan más difíciles (2).

1.1.4 Prevalencia de los nuevos Astrovirus

Los HAstV nuevos también han sido identificados en todo el mundo, sin diferencias significativas entre países industrializados y en desarrollo (2). En sólo un estudio realizado en Japón, los astrovirus MLB han sido encontrados en una proporción más alta que los astrovirus clásicos (10.6%) (59). Inesperadamente, a pesar de la baja prevalencia general, estudios serológicos en los Estados Unidos han reportado una alta seropositividad para MLB1 y VA1 (HMO-C) de 86% y 65%, respectivamente (60,61).

La publicación de varios reportes de casos de meningitis y encefalitis causados por infección de los nuevos HAstV ha provocado que los investigadores examinen retrospectivamente muestras de fluido cerebroespinal en busca de nuevos HAstV (32,62). La tasa de positivos es baja (0.2%), sugiriendo, que la infección del SNC por los HAstVs es de rara ocurrencia, o que la población analizada o el tipo de espécimen no son adecuados.

1.2 Generalidades Astrovirus

Los astrovirus son virus icosaédricos de 28 a 41 nm de diámetro, no envueltos con un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, se encuentran clasificados dentro de la familia *Astroviridae*. Se conoce que infectan a más de 30 especies de mamíferos y 14 especies de aves (63,64), lo que permite dividir a la familia *Astroviridae* en dos géneros, *Mamastrovirus* y *Avastrovirus*, que a su vez se dividen en genotipos o especies virales basados en las diferencias genéticas dentro de la proteína de cápside codificada por el ORF2 y en el rango de especies que afecta. Hasta el 2008, se conocían ocho genotipos de astrovirus clásicos que infectan a los humanos. En 2008 y 2009 se identificaron nuevos genotipos de HAstV, incluyendo dos clados distintos que fueron nombrados con base en el lugar donde se identificaron por primera vez: MLB (Melbourne) y VA (Virginia) los cuales son genéticamente más cercanos a los astrovirus que infectan otros animales que a los astrovirus clásicos (65).

1.3 Organización genómica

El genoma de los astrovirus es de 6.8 a 7.9 kb, tiene una región 5' no traducible, una región 3' no traducible con una cola de poli-adeninas, y tres marcos de lectura abiertos (ORFs): ORF1a que codifica una poliproteína no estructural (nsP1a), ORF1b que codifica la poliproteína no estructural 1ab, la cual contiene a la RNA polimerasa dependiente de RNA, y ORF2 que codifica para la proteína de cápside. ORF1a y ORF1b son traducidos a partir del RNA genómico (gRNA), con la expresión de ORF1b dependiendo de un cambio de marco ribosomal, por lo cual una proporción de ribosomas que traducen ORF1a hacen un cambio de -1 nucleótido para empezar a traducir ORF1b (66). El gRNA sirve como molde para producir RNA de polaridad negativa, el cual se conoce como RNA antígenómico (agRNA), a

partir del cual se produce el RNA genómico que principalmente forma a los genomas de la progenie viral y un pequeño fragmento que contiene la secuencia del ORF2, que se conoce como RNA subgenómico (sgRNA). El sgRNA codifica la proteína de cápside y es producido durante la replicación viral pero no es incorporado en el virión maduro (67). Recientemente, se demostró la existencia de un cuarto ORF, al que han llamado ORFX, el cual codifica para una proteína transmembrana que tiene un alto porcentaje de identidad con las viroporinas, y que se ha propuesto que le serviría al virus para salir de la célula (68). La organización del genoma de astrovirus se muestra en la Figura 2.

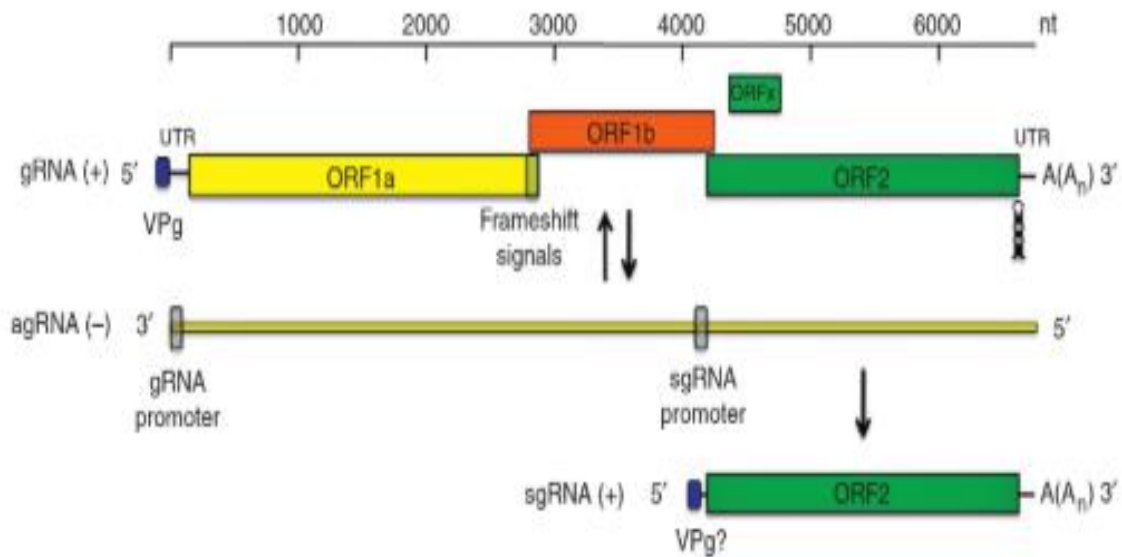


Figura 2. Organización del genoma de Astrovirus. Tomada de Méndez *et al*, 2013 (6).

1.4 Ciclo replicativo

Casi todo el conocimiento del ciclo proviene del estudio de los astrovirus clásicos y de otros virus con genomas similares, por lo que sólo se puede suponer que los astrovirus nuevos tienen un comportamiento similar. El ciclo replicativo de los astrovirus clásicos se muestra en la figura 3.

El receptor celular para los astrovirus es desconocido, aunque la observación de que diferentes líneas celulares son susceptibles a la infección dependiendo del serotipo de HAstV, sugiere que existe más de un receptor para la entrada del virus (69). Por medio de microscopía electrónica se han observado partículas de astrovirus en vesículas recubiertas de clatrina (70), por otro lado, la replicación del HAstV-8 puede ser bloqueada por inhibidores de la endocitosis mediada por clatrina (71), indicando que la entrada del virus se lleva a cabo por esta vía. El tiempo medio de la liberación del gRNA de HAstV-8 en el citoplasma es de alrededor de 130 minutos (71). La actividad de la proteína disulfuroisomerasa A4 es necesaria durante la entrada del virus, específicamente en la salida del virus de la vesícula endocítica y la liberación de su genoma hacia el citoplasma (72). De igual

manera, la replicación de los astrovirus es dependiente de la acidificación del endosoma, sugiriendo que el virus es endocitado y que no puede liberar su genoma hacia el citoplasma hasta que alcance el endosoma tardío (70,71). La localización precisa del sitio de replicación no se conoce, aunque se piensa que se encuentra asociada a membranas provenientes del retículo endoplásmico (73). El RNA presente en la partícula viral es el gRNA, el cual funciona como RNA mensajero (mRNA). Este lleva unida covalentemente a su extremo 5' una proteína denominada VPg, la cual es codificada por el virus, y está involucrada en diferentes funciones como la replicación del genoma, síntesis de proteínas virales y, potencialmente, la encapsidación del genoma (74). Las primeras proteínas traducidas después del desnudamiento son las proteínas no estructurales nsP1a y nsP1ab que son codificadas por el ORF1a y ORF1b, respectivamente. La secuencia que se sobrepone entre el ORF1a y el ORF1b es traducida por medio de un mecanismo conocido como cambio de marco de lectura, lo cual genera la proteína nsP1ab, la cual es procesada para generar a la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) (75). La RdRp usa el gRNA como molde para generar al agRNA, el cual sirve como molde para la producción de los dos RNAs de polaridad positiva del virus, el gRNA y el sgRNA (6). El gRNA se traduce en poliproteínas que son procesadas tanto por proteasas celulares como por la proteasa viral para generar al menos tres productos finales: la polimerasa, la proteasa y la proteína VPg (6,74). La síntesis de la proteína de cápside codificada por el ORF2, se lleva a cabo a partir del sgRNA, el cual se encuentra en exceso a las 12 horas posterior a la infección coincidiendo con los niveles más altos de producción de la proteína de cápside (76). La síntesis retrasada de la proteína estructural y la transcripción de grandes cantidades de sgRNA, son características comunes entre los virus de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva y se cree que es una estrategia para sobreponerse a la represión de la traducción por parte del huésped y/o promover el empaquetamiento del genoma viral (77). Sin embargo, el mecanismo y las señales que inician la traducción del sgRNA son desconocidos. La proteína de cápside es sintetizada como un precursor conocido como VP90, el cual es sometido a cortes sucesivos (75). Intracelularmente, las caspasas procesan a VP90 para generar VP70; 180 copias de esta proteína forman un virión inmaduro (78–80). Estudios han indicado que el corte por caspasas es necesario para la salida de la partícula viral (78,80), y es notable que el producto de 8 kDa proveniente del extremo carboxilo de VP90, que es generado por el corte de las caspasas está altamente conservado entre los genotipos, sugiriendo que tiene algún papel en la replicación (76).

La localización del ensamblaje puede ser dependiente de cepa; por ejemplo, se ha visto que HAstV-4 y HAstV-8 se agregan cerca del núcleo (73,81), mientras que el astrovirus ovino ha sido encontrado en los lisosomas y en vacuolas autofágicas del epitelio intestinal de corderos (82). Una vez que la partícula naciente ha sido formada, la cápside se auto ensambla (83,84) y el egreso viral ocurre por un mecanismo no lítico que no es acompañado de muerte celular significativa (80). Se ha postulado que el egreso de astrovirus es similar a las vías no líticas alternativas usadas por rotavirus y poliovirus, ocurriendo a través de

vesículas autofágicas (85) o a través de alguna forma de desestabilización de la membrana celular (75,76). La proteína XP codificada por el ORF X se asocia con la membrana plasmática y podría promover la salida eficiente del virus (68). El virión inmaduro es procesado posteriormente por proteasas extracelulares parecidas a tripsina para formar los viriones maduros, *in vitro* se usa tripsina para producir este procesamiento, lo cual genera tres productos llamados VP34, VP27, y VP25 (78–80). Este procesamiento aumenta la infectividad viral más de 100 veces (81). La proteína VP34 forma el núcleo de la cápside, mientras que VP27 y VP25 forman las espículas. Hay un estimado de 90 espículas en el virión inmaduro, que es reducido a 30 espículas en una partícula infecciosa (86).

La participación precisa de las proteínas del huésped durante el proceso de replicación no está bien descrita, aunque se ha propuesto que las regiones no traducibles del genoma viral reclutan factores del huésped requeridos para una replicación eficiente, estabilización del genoma e identificación de sitios de transcripción (75,87), como se ha descrito para muchos otros virus. Otros estudios han implicado a las proteínas del huésped asociadas con el metabolismo de fosfatidilinositol e inositol y con la síntesis de colesterol y ácidos grasos, así como la actividad de RNA helicasa, como necesarias para una replicación viral eficiente (88,89).

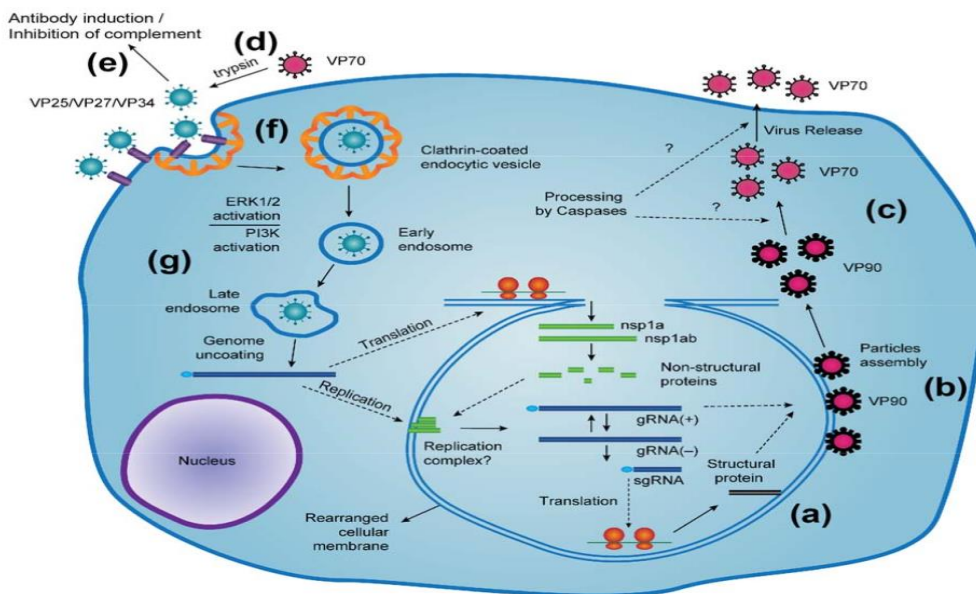


Figura 3. Ciclo replicativo de los Astrovirus clásicos. (a) Síntesis de la proteína de cápside de 90 KDa (VP90) a partir del RNA subgenómico; (b) Ensamblaje de las proteínas VP90 (180 copias) con el RNA genómico para formar la partícula viral; (c) Corte mediado por caspasas del extremo carboxilo de VP90 para formar VP70 y la liberación subsecuente de las partículas virales inmaduras; (d) Corte proteolítico extracelular de las partículas inmaduras para formar las partículas maduras infecciosas. En cultivo celular, tripsina es utilizada para producir las partículas maduras infecciosas; (e) Las partículas virales extracelulares inducen la producción de anticuerpos e inhiben la activación del complemento; (f) Unión y endocitosis dependiente de clatrina de las partículas virales; (g) Liberación del genoma viral en el endosoma tardío. La cinasa regulada por señal extracelular (ERK1/2) y la cinasa fosfoinositido-3 (PI3K) son activadas durante la unión o entrada del virus a la célula. Tomada de Arias y Dubois, 2017 (76).

1.5 Sistema Ubiquitina-proteasoma

El sistema ubiquitina-proteasoma es el principal sistema de degradación proteica en células eucariotas. Los papeles principales de este sistema consisten en la degradación de proteínas dañadas o mal plegadas (90,91) y la regulación del nivel de proteínas relacionadas al control de la progresión del ciclo celular, tráfico de proteínas, transcripción, respuesta inmune y transducción de señales (92,93). Este sistema está conformado por dos componentes principales: el primero es el proteasoma, un complejo multiproteico que degrada proteínas, y el segundo componente es la ubiquitina, molécula de marcaje que lleva al sustrato a la degradación proteica; la ubiquitina, además de su participación en el mecanismo de degradación de proteínas, cumple con otras funciones (94).

1.5.1 Ubiquitinación

La ubiquitinación de proteínas es una modificación postraduccional involucrada en varias funciones celulares; una de ellas es direccionar proteínas marcadas con ubiquitina para su degradación en el proteasoma. Dependiendo de la naturaleza de la ubiquitinación, esta modificación puede generar otros aspectos de la función proteica, independientemente de la degradación de proteínas, tales como interacciones proteína-proteína (95), señalización para la reparación del DNA, activación de factores de transcripción(96), entre otras.

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos altamente conservada que se une covalentemente a proteínas blanco mediante una reacción de tres pasos, conocida como ubiquitinación. Durante la ubiquitinación, la ubiquitina se une covalentemente a la proteína blanco por un enlace isopeptídico entre la glicina del extremo carboxilo terminal de la ubiquitina y, usualmente, el grupo ϵ -amino de la lisina en la proteína blanco. Enlaces isopeptídicos similares son formados entre el carboxilo terminal de la ubiquitina con el grupo ϵ -amino de la lisina de otra molécula de ubiquitina para formar cadenas de poliubiquitinas (97). En algunas proteínas la poli-ubiquitinación puede ocurrir en el residuo amino terminal (98). El residuo de lisina en el que la poli-ubiquitinación sucede es importante. Por ejemplo, la formación de cadenas de poli-ubiquitina por unión en el residuo de lisina 48 y lisina 29 de la ubiquitina puede actuar como una señal para la degradación mediada por proteasoma, mientras que la ubiquitinación en otros residuos de lisina, como en la lisina 63 puede actuar como señal para la reparación del DNA y para la activación de factores de transcripción (96). Por otro lado, la mono-ubiquitinación de proteínas tiene otras funciones como la endocitosis, regulación de histonas y gemación de virus, entre otras (99).

La ubiquitinación es llevada a cabo por una serie de reacciones enzimáticas catalizadas por la enzima activadora (E1), la enzima conjugadora (E2), y la ubiquitina ligasa (E3). Primero, la ubiquitina es activada por E1 en presencia de ATP, resultando en la formación de un intermediario ubiquitina-AMP, obteniendo como producto final la ubiquitina unida a la E1 por medio de un enlace tioéster. La ubiquitina unida a la E1 es reconocida por múltiples E2,

a la cual la ubiquitina es transferida por medio de otro enlace tioéster. Las enzimas E2 se asocian con las enzimas E3 en una manera específica, aunque cada E2 puede unirse a más de una E3. De esta manera, las enzimas E3 son las responsables de la selección y especificidad del blanco final. El sistema de ubiquitinación tiene una estructura jerárquica, en humanos se han reportado dos enzimas E1 (la cual activa la ubiquitina para las reacciones de conjugación), alrededor de 30 enzimas E2 que interactúan con una o varias E3 y un número cada vez mayor de enzimas E3, contando actualmente con casi 600, la cual tiene uno o varios sustratos blanco y, por lo tanto, es la que confiere la especificidad al sustrato (100). Las E3 ligasas están agrupadas en tres clases de acuerdo a sus dominios únicos, que incluye a las E3 ligasas de la clase RING (Really Interesting New Gene), HECT (Homologous to E6AP C-Terminus) y RBR (RING between RING) (101).

Las ligasas E3 de la clase RING catalizan la transferencia de la ubiquitina directamente de la enzima conjugadora E2 a la proteína blanco, mientras que las ligasas de las clases HECT y RBR3 transfieren la ubiquitina de la E2 a ellas mismas y después la transfieren a la proteína blanco (102).

1.5.2 Desubiquitinadas

El proceso de ubiquitinación es reversible mediante un proceso denominado “desubiquitinación” el cual es realizado por enzimas deubiquitinadoras (DUB) (103). Estas enzimas tienen una función importante en la regulación del sistema ubiquitina proteasoma, incluyendo la corrección de los conjugados ubiquitina-proteína (104).

Alrededor de 100 DUBs han sido identificadas en el humano, y son clasificadas en 7 familias (105) y categorizadas en dos clases: las cisteína proteasas y las metaloproteasas dependientes de zinc (106). La clase cisteína proteasas incluye: las hidrolasas carboxi-terminal de ubiquitina (UCH), las proteasas específicas de ubiquitina (USP), las proteasas de la enfermedad Machado Joseph (MJD), la proteasa de tumor ovárico (OTU), la peptidasa 1 de ubiquitina que contiene dedo de zinc (ZUP1), y la nueva familia de DUBs que contiene un motivo de interacción con ubiquitina (MINDY). La otra clase de DUBs, comprende a las metaloproteasas dependientes de zinc, la cual hasta el momento contiene únicamente a la metaloenzima JAB1/MPN/Mov34 (JAMM) (105).

1.5.3 Proteasoma

La unión de al menos cuatro cadenas de ubiquitina unidas por sus lisinas 48 marca a las proteínas como sustrato para el proteasoma 26S, un complejo citosólico de degradación proteica. Este complejo consiste en un núcleo catalítico (conocido como proteasoma 20S), unido a una o dos partículas activadoras (denominadas proteasoma 19S). El proteasoma 20S es un complejo proteolítico con forma de barril, el cual está tapado en uno o ambos extremos por complejos reguladores 19S, los cuales reconocen a las proteínas marcadas con ubiquitina, las despliegan y las translocan hacia el complejo 20S donde son degradadas a oligopéptidos. También se conocen otros activadores del proteasoma aparte de la

partícula reguladora 19S, también conocida como PA700, entre los que se encuentran PA28, y PA200/Blm10; además de los proteasomas compuestos por 2 partículas reguladoras idénticas, los proteasomas híbridos con diferentes activadores en los extremos de la partícula núcleo también han sido observados (107). La partícula reguladora 19S puede ser dividida en dos largos subcomplejos, llamados la base y la tapa (108). El papel principal de la tapa es reconocer la ubiquitina y coordinar la desubiquitinación del sustrato, mientras que la base lleva a cabo el desdoblamiento y la translocación de los sustratos polipeptídicos hacia la cámara catalítica. La base incluye un anillo heterohexamérico de ATPasas AAA (subunidades Rpt) que son responsables de estas últimas actividades (109).

1.5.3.1 Partícula núcleo

Como se muestra en la figura 2A, la partícula núcleo del proteasoma constitutivo está compuesta de dos anillos con siete subunidades α y dos anillos con siete subunidades β . Los anillos están apilados uno encima de otro para formar un cilindro hueco con los anillos β en el centro siendo flanqueados por un anillo α en cada extremo. Tres subunidades β en cada anillo contienen un sitio proteolítico, en el cual un residuo de treonina en el amino terminal de cada subunidad provee el nucleófilo catalítico que ataca los enlaces peptídicos en el sustrato. Los sitios miran hacia una gran cavidad interna y son accesibles únicamente a través de poros en los pequeños extremos del cilindro formado por los anillos α (110).

Los proteasomas eucariotas exhiben tres actividades principales de peptidasa: actividad parecida a la quimotripsina (corte después de aminoácidos hidrofóbicos), actividad parecida a la tripsina (corte después de aminoácidos básicos) y actividad parecida a caspasa (corte después de aminoácidos ácidos) (110).

En las células de mamíferos, se han descrito variantes de la partícula núcleo en las cuales las subunidades activas del proteasoma 20S han sido reemplazadas por parálogos inducibles o específicos de tejido. El inmunoproteasoma es la variante mejor estudiada (111). Éste tiene tres sustituciones de subunidades β ; β_{1i} , β_{2i} y β_{5i} que reemplazan a β_1 , β_2 y β_5 , respectivamente. Estas subunidades alternativas son 60% idénticas a las subunidades que reemplazan. El inmunoproteasoma altera la población de péptidos generados para la presentación del antígeno por el MHC I (111). La mayoría de los inmunoproteasomas llevan las tres subunidades β_i en cada anillo β , aunque algunos son ensamblados como proteasomas mixtos, los cuales contienen tanto las subunidades β constitutivas como las β_i (112). Esto implica cierta flexibilidad en la adición de subunidades durante el ensamblaje del proteasoma, mejorando con esto la diversidad de péptidos para la presentación de antígenos.

El proteasoma específico del timo es otra isoforma alternativa de la partícula núcleo, el cual es ensamblado exclusivamente con subunidades β_{1i} , β_{2i} y β_{5t} en posiciones esperadas en el anillo β aun en presencia de β_{5i} (111). El timoproteasoma tiene un papel esencial en la selección positiva de las células T CD8⁺ (113).

Además de los proteasomas con subunidades β sustituidas, existen partículas núcleo que contienen subunidades α alternativas. Dentro de estos se encuentran los espermato proteasomas, que contienen una subunidad $\alpha 4$ alternativa llamada $\alpha 4s$, la cual es sintetizada exclusivamente en las células germinales del macho después de su diferenciación en espermatoцитos (114), y los proteasomas específicos de los testículos, que contienen una subunidad $\alpha 6$ alternativa ($\alpha 6T$), el cual es esencial para la fertilidad en *Drosophila* (115).

1.5.3.2 Activadores del proteasoma

Para ser degradadas, las proteínas plegadas son reconocidas por los activadores del proteasoma (PA), desplegadas, y translocadas en el núcleo proteolítico. A la fecha, tres tipos de PA han sido identificados: PA700 (también llamado el complejo 19S), PA200, y los complejos PA28 (116). PA700 se une al proteasoma 20S en una manera dependiente de ATP formando al proteasoma 26S, el cual tiene un papel principal en el control de la homeostasis celular ya que degrada proteínas que están marcadas por ubiquitina, así como algunas proteínas no ubiquitinadas (116). PA700 está conformada por una tapa y una base compuestas por un total de 19 subunidades. La base contiene nueve subunidades: un anillo de seis subunidades con actividad de ATPasa (Rpt1-Rpt6) que forma el canal de translocación del sustrato en su centro, dos largas subunidades (Rpn1 y Rpn2) que forman las plataformas de interacción para las proteínas asociadas con el proteasoma que reconocen o modifican a los sustratos y el receptor de ubiquitina Rpn13 (117–119). La tapa actúa como un andamiaje que abraza un lado de la base y está compuesta de 9 subunidades, 8 de estas tiene un papel estructural, mientras que la subunidad Rpn11 es una deubiquitinasa dependiente de zinc perteneciente a la familia JAMM/MPN (120). El proteasoma contiene adicionalmente una o dos deubiquitininas asociadas establemente, Ubp6 y Uch37 (120). El receptor de ubiquitina adicional, Rpn10, no es considerado parte de la base o de la tapa *per se*, si no que sirve como puente para unir ambos subcomplejos en el activador del proteasoma ensamblado (121).

A diferencia de PA700, PA200 y PA28 no requieren de ATP para unirse al proteasoma 20S, los complejos resultantes apuntan a la degradación de proteínas independiente de ubiquitina, a menos que sean parte de una forma híbrida del proteasoma que contenga a PA700 en el otro extremo (122,123). En eucariotas superiores existen tres isoformas de PA28 (también conocido como 11S): PA28 α , β , y γ (124). Aunque, se ha reportado generalmente que los activadores 11S estimulan la hidrólisis de sustratos peptídicos pero no de proteínas, PA28 γ ha sido implicado en la degradación de algunas proteínas nativas mal plegadas (125). Por su parte, varios estudios han implicado a PA28 $\alpha\beta$ en la producción de ligandos del MHC de clase I (126). Se ha propuesto que este activador puede funcionar en el contexto de proteasomas híbridos, en los cuales se unen al extremo del proteasoma opuesto donde se encuentra la partícula activadora 19S, y localizan la capacidad de degradación del complejo activador 19S a un ambiente celular específico (124). Al igual que

los activadores 11S, Blm10/PA200 (*Saccharomyces cerevisiae*/humano) se cree que estimulan la hidrólisis de péptidos pero no de proteínas (127). Se piensa que por su arquitectura cerrada Blm10/PA200 no funciona en la degradación de proteínas y que más bien sirven como adaptadores que funcionan en el contexto de proteasomas híbridos (127).

La estructura de los diferentes tipos de proteasoma 20S con sus partículas reguladoras se ilustra en la figura 4.

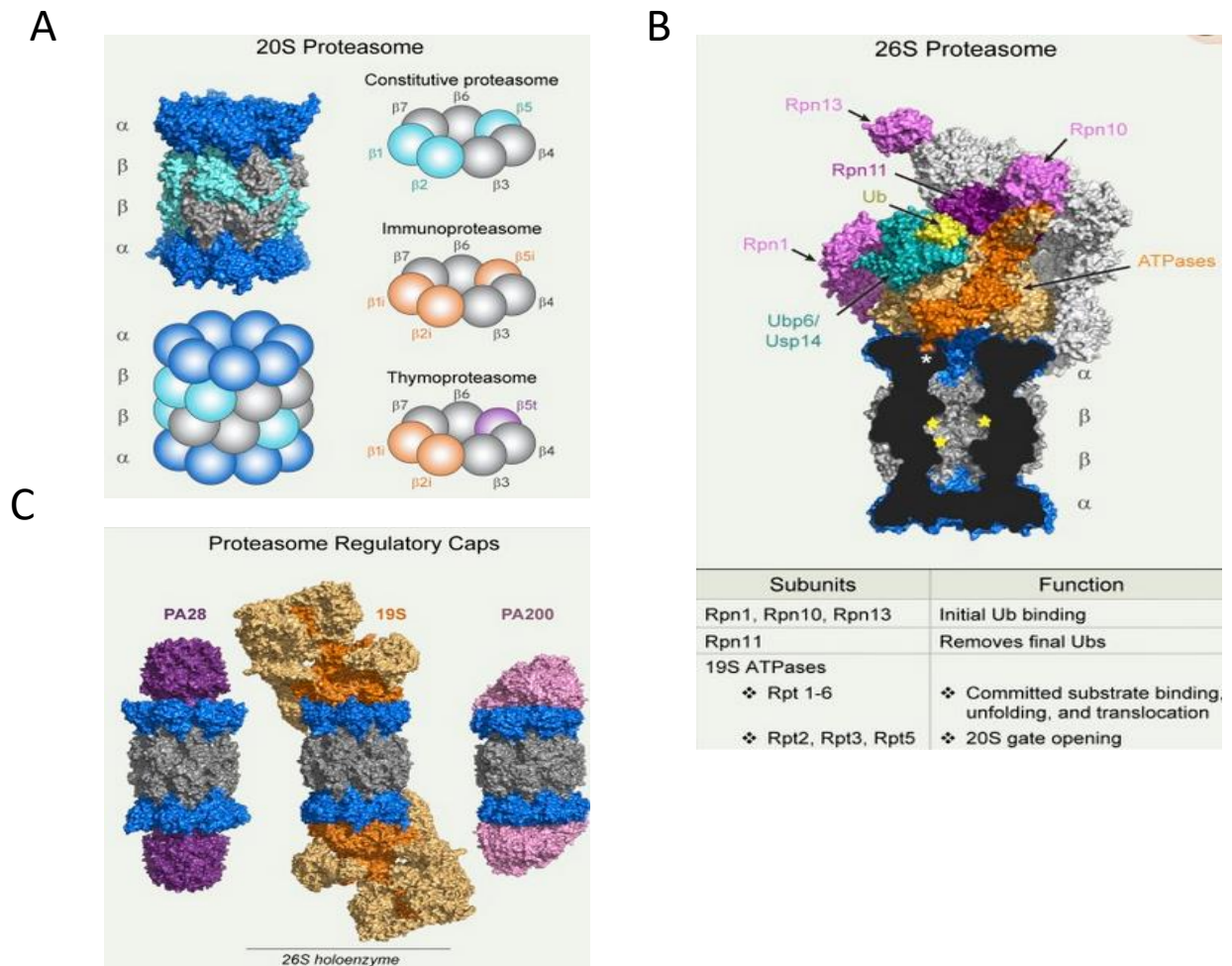


Figura 4. Estructura y función del proteasoma. (A) Estructuras y representaciones gráficas del proteasoma 20S, resaltando las diferentes combinaciones de subunidades β que se encuentran en proteasomas de tejidos específicos. (B) Estructura del proteasoma 26S en complejo con Ubp6. Una sección transversal del proteasoma 20S revela el carboxilo terminal de la ATPasa Rpt5 (naranja oscuro) posicionado en la hendidura entre subunidades α (asterisco blanco). Los sitios proteolíticos están marcados con estrellas amarillas. (C) Proteasomas 20S (azul y gris) en complejo con partículas reguladoras: PA28, 19S, y el homólogo de Blm10 en humanos PA200. Las ATPasas de la partícula 19S están en naranja oscuro, mientras que las subunidades no ATPasas se muestran en naranja claro. (Tomado de Thibaudeau *et al*, 2019 (128)).

1.5.4 Inhibidores del proteasoma

Los primeros inhibidores del proteasoma fueron simples péptido-aldehídos hidrofóbicos (análogos de inhibidores de serina-proteasas) diseñados para imitar los sustratos preferidos del sitio parecido a la quimotripsina del proteasoma ($\beta 5$) e inhibirlo (129). MG132 (Carbobencil-Leu-Leu-Leu-aldehído), es el inhibidor del proteasoma más utilizado en la investigación científica debido a que es potente, no costoso y rápidamente reversible (129). Dado el papel indispensable del proteasoma en la vía del NF- κ B, los inhibidores del proteasoma mostraron potencial terapéutico para el tratamiento de algunas enfermedades (129).

Se ha hipotetizado que una inhibición reversible y parcial del proteasoma debería ser beneficiosa para matar células neoplásicas, debido a que éstas carecen de varios de los mecanismos de control que protegen a las células normales de la apoptosis (93). Los aldehídos inhibidores del proteasoma, como MG132, han tenido un potencial terapéutico limitado debido a sus efectos indirectos (inhibición de catepsina B y calpaínas) y a su pobre estabilidad metabólica (130). Con MG132 como componente principal se sintetizó el ácido borónico dipeptídico PS-341 (Pyz-Phe-boroLeu), un inhibidor reversible más lento del sitio activo $\beta 5$ (con algo de actividad hacia el sitio activo $\beta 2$). PS-341 demostró ser un inhibidor del proteasoma potente y selectivo, con actividad terapéutica en modelos preclínicos de enfermedades inflamatorias y cánceres humanos (131–133). PS-341 se utilizó en ensayos clínicos de fase I, en los cuales, de manera notable, un paciente con mieloma múltiple (MM) mostró una respuesta completa al tratamiento con PS-341 (133). En aquel tiempo, los pacientes con MM tenían un pobre pronóstico debido a la falta de opciones de tratamientos efectivos, haciendo de la completa respuesta a PS-341 un avance clínico espectacular (129). PS-341 progresó a los ensayos clínicos de fase II para MM y leucemia linfocítica crónica. Debido al notable éxito de PS-341 en los ensayos de fase II, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó en 2003 a PS-341 (después renombrado como bortezomib y conocido comercialmente como Velcade) como tratamiento para el mieloma múltiple recidivante y refractario (RRMM) (129).

A pesar de su éxito clínico en el tratamiento de enfermedades hematológicas, la terapia con bortezomib se asocia con una alta tasa de resistencia (primaria o secundaria) y una toxicidad que limita la dosis, lo cual requiere de la reducción o discontinuación de la droga (134). Los avances en la química de los inhibidores del proteasoma y un mejor entendimiento de su mecanismo catalítico único, ha conducido al desarrollo de inhibidores del proteasoma de segunda generación con farmacocinéticas mejoradas comparadas con el bortezomib (135).

1.5.4.1 Clases químicas de los inhibidores del proteasoma

La mayoría de los inhibidores del proteasoma son péptidos pequeños diseñados para encajar en el sitio de unión al sustrato en el sitio catalítico. La actividad de los inhibidores del proteasoma depende de su extremo carboxilo terminal, el cual reacciona con la treonina nucleofílica de los sitios activos para formar aductos covalentes reversibles o irreversibles

(136). Aunque el proteasoma tiene tres tipos de sitios catalíticos, no se requiere la inhibición de todos para afectar significativamente la degradación proteica (137). La inhibición específica de $\beta 1$ o $\beta 2$ no tiene un efecto significativo sobre la degradación general de proteínas; sin embargo, la inhibición de $\beta 5$ resulta en una disminución significativa de la degradación proteica (137). Debido a esto, la mayoría de los inhibidores del proteasoma van dirigidos contra el sitio $\beta 5$, aunque algunas veces tengan menor actividad en contra de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ (137).

1. Péptido-aldehídos: los péptido-aldehídos (MG132) fueron los primeros inhibidores del proteasoma en ser sintetizados, además de ser inhibidores bien conocidos de serina y cisteína proteasas (138). MG132 es un inhibidor permeable y reversible. Debido a que MG132 tiene cinéticas de unión lentas y de disociación rápidas (136), los efectos de la inhibición del proteasoma por MG132 en cultivo celular son rápidamente reversibles al cambiar el medio por uno libre de inhibidor. Sin embargo, su uso tiene varias limitaciones. En primer lugar, en el medio del cultivo celular es rápidamente oxidado a un ácido inactivo (136), por lo que para experimentos largos en cultivo celular, el medio conteniendo MG132 debe ser reemplazado diariamente. En segundo lugar, como con otros aldehídos peptídicos, MG132 también inhibe (aunque con una afinidad mucho más baja) calpaínas y catepsinas (136); por lo tanto, es necesario realizar controles de los experimentos para confirmar que los efectos observados son debidos a la inhibición del proteasoma. La participación del proteasoma puede verificarse usando un inhibidor más selectivo (epoxomicin, boronatos o lactacystin). Además, inhibidores que específicamente bloquean otras proteasas, pero no el proteasoma pueden ser usados para confirmar que los efectos observados no son debidos a la inhibición indirecta de otra proteasa.
2. Boronatos peptídicos: los boronatos peptídicos son inhibidores del proteasoma significativamente más potentes comparados con los péptido-aldehídos. Al igual que los péptido-aldehídos, forman un aducto con la treonina del sitio activo pero su tasa de disociación es mucho más lenta, haciendo a los boronatos prácticamente irreversibles sobre escalas de tiempo de unas horas(136). Además, los boronatos no son oxidados en formas inactivas como en MG132, haciéndolos más estables *in vivo* (136). El boronato no puede reaccionar con las cisteínas de sitios activos, por lo que tienen menos blancos además del proteasoma (136).
3. Epoxomicina y Epoxicetonas: la epoxomicina es otro inhibidor del proteasoma derivado naturalmente, ya que es un metabolito de la fermentación de los actinomicetos. La epoxomicina es extremadamente específica para el proteasoma, sin tener efecto inhibitorio en otras proteasas como calpaína, tripsina, quimotripsina, papaína o catepsina (139). La epoxomicina reacciona

covalentemente tanto con el hidroxilo de la treonina N-terminal, catalíticamente activo, como con el grupo amino libre (140). A diferencia de otros inhibidores del proteasoma que sólo forman un enlace con el hidroxilo de la treonina, la formación del doble enlace covalente del grupo epoxicetona limita la reactividad de epoxomicin hacia las proteasas que tengan una treonina nucleofílica N-terminal sin inhibir otra proteasa celular (141). El inhibidor epoxicetona mejor caracterizado es carfilzomib, un inhibidor aprobado por la FDA, de segunda generación, para el tratamiento de mieloma múltiple recidivante y refractario.

4. Lactacistina y β -lactona: Lactacistina, un metabolito de *Streptomyces*, es un inhibidor del proteasoma no peptídico. Por sí solo no inhibe al proteasoma, pero a pH neutro lactacystin espontáneamente se convierte a clasto-lactacystin- β -lactona, el cual reacciona con el proteasoma. La β -lactona reacciona con la treonina del sitio activo del proteasoma, resultando en la apertura del anillo β -lactona y la acilación del hidroxilo de la treonina catalítica del proteasoma (141). Lactacystin es más específico que MG132, con un único sustrato indirecto (catepsina A). Aunque lactacistina es considerado un inhibidor irreversible, su aducto es lentamente hidrolizado (vida media de aproximadamente 20 horas) (142).
5. Vinyl sulfonas: las vinyl sulfonas peptídicas son una clase de inhibidores irreversibles del proteasoma. También inhiben cisteína proteasas (catepsinas) (143). Interesantemente, las vinyl sulfonas son inhibidores selectivos más potentes del sitio parecido a tripsina comparado con las epoxicetonas con una secuencia peptídica idéntica (144), una característica explotada en el desarrollo de inhibidores del proteasoma específicos para β 2.

1.6 Sistema Ubiquitina-Proteasoma en infecciones virales

Los virus pueden codificar proteínas con actividades parecidas a la ubiquitina ligasa, a las DUB, o modificar la función del SUP, de tal manera que se beneficie su replicación. El SUP juega un rol dual en la patogénesis viral, ya que afecta o favorece la replicación viral (100,145). El SUP puede mejorar la función de proteínas virales por medio de modificaciones postraduccionales a través de la ubiquitina o de proteínas parecidas a la ubiquitina. También puede facilitar la infección viral mediante la regulación tanto de las proteínas virales como de las proteínas celulares. Por otra parte, la degradación de proteínas virales mediada por el SUP puede constituir un proceso de defensa del huésped contra las infecciones virales. Debido a esto último, los virus han desarrollado mecanismos sofisticados para contrarrestar esta respuesta inmune antiviral (146).

1.6.1 Degradación de proteínas celulares por el SUP durante la infección viral

Algunas proteínas celulares pueden funcionar como factores de restricción para limitar la infección viral al inhibir directamente la replicación del virus o al controlar el estado de las células infectadas, en particular para determinar si se induce apoptosis en la célula o si se actúa durante la progresión del ciclo celular. En el caso de virus que dependen del ciclo celular, el SUP es utilizado para controlar el nivel de proteínas que regulan la progresión del ciclo, característica observada frecuentemente en infecciones de virus con genoma de DNA (147). Por otro lado, se ha reportado que la proteína supresora de tumores p53 bloquea la replicación viral al suprimir la activación de genes virales y/o promoviendo la apoptosis de la célula huésped (148). Para contrarrestar esto, los virus pueden reclutar las ligasas E3 celulares para marcar proteínas antivirales para su degradación. Las proteínas E6 y E7 del papilomavirus humano (HPV) y la proteína E1B55k/E4orf6 de adenovirus, inducen el ensamblaje de un complejo E3 ligasa que contiene la proteína viral y la E3 celular para catalizar la ubiquitinación de p53 y la subsecuente degradación del mismo por el proteasoma (149,150). Además de la conjugación de ubiquitina, la expresión de p53 también puede estar regulada en los niveles de desubiquitinación y actividad del proteasoma. Por ejemplo, se ha reportado que el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein-Barr interactúa con la proteasa 7 específica de ubiquitina (USP7, una DUB celular) para mejorar la degradación de p53, presumiblemente a través de inhibir la actividad de USP7 y por lo tanto previniendo la desubiquitinación de p53 (151).

Las interacciones entre los virus y el SUP son complejas; una de las características más comunes es el uso de este sistema para controlar el nivel de factores antivirales y para regular la señalización antiviral innata. Una estrategia común de evasión de la respuesta inmune por parte de los virus, es tomar como blanco los adaptadores inmunes y las moléculas de señalización (moléculas involucradas en la respuesta de IFN I y la presentación de antígeno por MHC de clase I) para su degradación por el proteasoma (152–154). Alternativamente los virus pueden inhibir la señalización antiviral al prevenir la destrucción de inhibidores de factores de transcripción relacionados a la respuesta inmune (como I κ B α , un inhibidor del NF κ B) (152). Una manera en que los virus reducen la señalización de la respuesta inmune innata es mediante la inhibición de la ubiquitinación del gen inducible del ácido retinoico (RIG-I). RIG-I está compuesto de dos dominios N-terminal de reclutamiento y activación de caspasas (CARDs), un dominio central caja DExD/H helicasa/ATPasa, y un dominio carboxilo terminal regulador (CTD/RD). Bajo condiciones normales, RIG-I está en una conformación cerrada e inactiva. Durante el reconocimiento del RNA viral, la exposición de los CARDs conduce a la formación de cadenas de ubiquitina unidas a través de la lisina 63 en el residuo de lisina 172 de RIG-I, llevado a cabo por TRIM25 (155). La ubiquitinación de los CARDs permite que RIG-I se una a MAVS y señale río abajo para permitir la fosforilación de IRF3 y la producción de IFN I (156). Riplet, otra ubiquitin ligasa E3, también promueve la habilidad de RIG-I para transducir señales y producir interferón, mediante la formación de cadenas de ubiquitina ligadas a través de la lisina 63

en los residuos de lisina 849 y 851 en el CTD de RIG-I (157). La inhibición de la respuesta inmune innata se logra por medio de la interacción de proteínas virales con las ligasas E3, TRIM25 y Riplet (158), y mediante la acción de desubiquitinasas como la desubiquitinasas ORF64 codificada por el virus del sarcoma de Kaposi, la cual corta las cadenas de ubiquitina en la lisina 63 dentro de los dominios CARDS, lo que bloquea la interacción entre RIG-I y MAVS, y disminuye la señalización de RIG-I (159). De igual manera, la proteína NSP1 de rotavirus estimula la degradación por proteasoma del factor de transcripción IRF3 y de la proteína de unión al sustrato β -TrCP, lo que inhibe la producción de IFN (160). Mientras que la señalización del IFN de tipo I puede ser bloqueada por la degradación proteasomal de STAT2 estimulada por la proteína NS5 del virus de dengue (161).

El silenciamiento de RNA es un importante mecanismo de defensa del huésped contra infecciones virales en plantas. Para combatir esta inmunidad antiviral, varios virus de plantas codifican proteínas para dirigir componentes clave del silenciamiento de RNA hacia su degradación proteasomal, como la proteína ARGONAUTA1, la cual une RNAs pequeños con mRNAs blanco para degradarlos o inhibir su traducción (162).

La reducción de la presentación antigénica mediante la regulación negativa de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC I) ha llegado a ser un mecanismo común usado por los virus para evadir la vigilancia inmune. Los virus han desarrollado diferentes estrategias para escapar de las respuestas inmunes del huésped por medio de la inhibición de la presentación de antígenos por moléculas del MHC I. Un ejemplo de esto son las proteínas US2 y US11, codificadas por el citomegalovirus humano, las cuales inducen la dislocación del MHC de clase I desde el retículo endoplásmico hacia el citoplasma, donde las moléculas del MHC son poliubiquitinizadas y rápidamente degradadas por el proteasoma (163).

Mientras que en la mayoría de los casos la degradación de factores celulares por el SUP es necesaria para una replicación viral efectiva, en otros puede resultar perjudicial para el virus, como en el caso del virus del ápice rizado de la remolacha, en el cual la proteína viral C2 atenúa la degradación de la decarboxilasa S-Adenosín-Metionina 1 (SAMDC1), la cual cataliza la conversión de S-Adenosín-metionina (SAM) a S-Adenosín-metionina decarboxilada (dcSAM). Debido a que SAM es el mayor donador de metilos en los procesos de metilación, incluyendo la metilación del DNA, y a que dcSAM es considerado un inhibidor competitivo de SAM, la atenuación de la degradación de SAMDC1 resulta en altas concentraciones de dcSAM con una alta inhibición de la metilación del DNA viral (164).

1.6.2 Degradación de proteínas virales por el SUP

Los virus usan el SUP para mantener algunas proteínas virales en bajas cantidades, en su mayoría las no estructurales, como la RNA polimerasa dependiente de RNA que llega a ser antiviral cuando se encuentra en cantidades altas debido a que interfiere con el empaquetamiento viral (165). Otro ejemplo de degradación de proteínas virales no

estructurales es la proteína E7 del virus del papiloma, la cual es ubiquitinada y degradada a través de dos vías independientes. Una involucra al supresor inducible por IFN y de la citocina de señalización-1 (SOCS1), un miembro de la vía de señalización de STAT, ocurriendo esta degradación en el citoplasma (166). La otra requiere del complejo SCF E3, el cual induce la ubiquitinación de E7 con la asistencia de la enzima E2 UbcH7 y la subsecuente degradación en el núcleo(167).

Algunas proteínas estructurales también son degradadas por el SUP. Por ejemplo, la proteína de cápside del virus del Oeste del Nilo, al igual que la del circovirus porcino de tipo 2, son ubiquitinadas por la proteína 1 del dedo anular Makorin (MKRN1), una E3 ligasa celular, y degradada por el proteasoma (168,169). También se ha visto que la proteína núcleo del virus de la hepatitis C es degradada vía proteasoma de manera dependiente de la ubiquitina a través de E6AP (una E3 ligasa), y de una manera independiente de ubiquitina mediada por la partícula activadora del proteasoma PA28 γ (170).

Varias proteínas de virus de plantas también son degradadas por el SUP. Un ejemplo es la proteína de movimiento del virus del mosaico del tabaco, la cual es poliubiquitinizada y degradada por el proteasoma (171). Mientras que la replicación del virus rugoso del tomate es inhibida por la degradación de la proteína de replicación p92, lo que es promovido por su unión a la proteína Rsp5p celular, un miembro de la familia de E3 ligasas Nedd4 (172). Así, la degradación de algunas proteínas virales puede ser un mecanismo de defensa antiviral del huésped.

2. Antecedentes

El astrovirus VA1 se identificó en 2009 en un brote de diarrea en niños en Virginia (9). Este virus, además de generar enfermedad gastrointestinal se ha reportado como el agente causal de encefalitis en pacientes inmunocomprometidos, donde ha generado la muerte en 4 de 6 casos en los que se detectó (26–28,30,41,62). A diferencia de los demás astrovirus, el VA1 está relacionado filogenéticamente con astrovirus que generan neuropatías en bovinos, ovinos, porcinos y mink, estando ubicados dentro del mismo clado (173). Además de su tropismo por el sistema nervioso, se ha encontrado VA1 en una muestra nasofaríngea de un niño con enfermedad respiratoria (174), lo que sugiere una vía de infección extraintestinal.

Actualmente no se cuenta con mucha información sobre el ciclo replicativo de VA1 debido a que no se había cultivado en una línea celular, lo que se logró en 2017 (175). Esto da paso a la realización de estudios para elucidar la biología del virus y los mecanismos para causar enfermedad.

A diferencia de los astrovirus clásicos, VA1 no necesita ser procesado con un tratamiento de tripsina exógena para que pueda infectar células en cultivo, no afecta las uniones celulares y tiene un ciclo replicativo más lento (176). Como ejemplo de esto último, al comparar VA1 con el astrovirus clásico HAstV-1 mediante la realización de una cinética de replicación en la cual se analizó la formación del RNA de doble cadena (dsRNA), que es un indicativo de la replicación del virus, y la producción de la cápside, se obtuvieron niveles detectables de ambos a las 6 horas después de la infección (hpi) en células infectadas con el HAstV-1, en contraste el dsRNA se observó hasta las 12 hpi, y la cápside hasta las 18 hpi en células infectadas con VA1 (176).

Para evaluar la cinética de infección de VA1 se han medido las copias de RNA virales en diferentes líneas celulares, en las cuales se observó que las copias de RNA aumentaron de 10 a 100 veces en las primeras 24 horas, incrementando otras 10 veces a las 96 horas(175). Por otra parte, en un trabajo realizado previamente en nuestro laboratorio se evaluó la producción de proteínas estructurales y de progenie viral hasta las 72 hpi (177), en estos experimentos se observó que el período en el que no hay producción de partículas virales tendría una duración de aproximadamente 12 horas, y que el periodo en el que se comienzan a producir partículas virales iría desde este tiempo hasta las 48 horas, momento en el cual la producción de partículas alcanza la meseta (fig. 5 A). Mientras que las proteínas estructurales del virus se identificaron a partir de las 18 horas y alcanzaron su máximo nivel de expresión a las 48 horas (fig. 5 B), estas observaciones en conjunto indican que el ciclo replicativo del astrovirus VA1 tiene una duración aproximada de 48 horas.

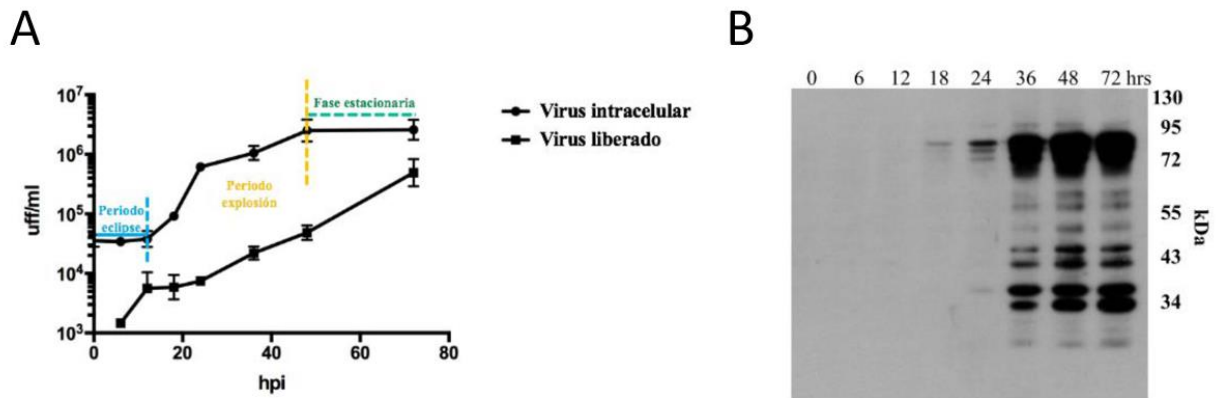


Figura 5. Evaluación de la progenie y de las proteínas estructurales de astrovirus VA1 durante 72 horas. (A) Células Caco-2 se infectaron a una MOI de 3 y el título fue determinado por medio de un ensayo de focos infecciosos con muestras tomadas a las 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 y 72 horas post infección (hpi). (B) Las proteínas estructurales fueron evaluadas por medio de un western blot con muestras tomadas a las mismas hpi. (Tomado de *Aguilera, C. 2020 (177)*).

Previamente, se reportó la reducción de la progenie de la cepa Yuc8 del astrovirus humano HAsTV-8 al inhibir la ubiquitinación y el proteasoma (178), ya que al utilizar los inhibidores del proteasoma MG132, lactacistina y PSI, los cuales tienen diferentes mecanismos de acción, se redujo la progenie viral sugiriendo que la actividad proteolítica del proteasoma es necesaria para la replicación de HAsTV. Al utilizar la droga inhibidora de la ubiquitinación Pyr-41 y siRNA para ubiquitina también se observó una disminución de la producción de progenie viral, lo que sugiere que la degradación de proteínas mediada por ubiquitinación es importante para el virus; sin embargo, no se descarta que la ubiquitina puede tener un papel en la replicación del virus, independientemente de la degradación proteica.

Con los resultados obtenidos en ese trabajo se sugirió que la actividad proteolítica del proteasoma sería requerida para la producción eficiente de los RNA virales de cadena positiva durante la replicación del HAsTV-8. Esto se explicaría si el proteasoma fuera responsable de la degradación de un factor celular que afecte la generación de gRNA y sgRNA mediante la inhibición del complejo de la RdRp. Una alternativa a este mecanismo sería que el proteasoma degradara un factor celular que sea responsable de afectar la estabilidad y no la producción de los RNAs de cadena positiva (por ejemplo, una RNAsa), por lo que sería posible que el agRNA presente sólo en los centros de replicación viral asociados con membranas, estuviera protegido de las RNAsas celulares, pero los RNAs positivos presentes en el citoplasma estuvieran disponibles para la degradación por estas RNAsas.

Por otro lado no se descartó que el proteasoma sea necesario para la degradación de factores de la respuesta inmune innata que restrinjan la replicación de este virus, o para la

degradación o procesamiento de proteínas que modulan la producción de los RNAs de polaridad positiva directa o indirectamente (178).

3. Justificación

Las enfermedades diarreicas son la segunda causa de muerte en niños; cada año ocurren alrededor de 1.7 billones de casos de gastroenteritis aguda y 525 000 muertes en niños menores de cinco años (179). La mayoría de los casos en niños están asociados con infecciones virales causadas por rotavirus, calicivirus, enterovirus, sapovirus, astrovirus y adenovirus entéricos (180). Estudios epidemiológicos alrededor del mundo han colocado a los astrovirus como una de las principales causas a nivel mundial de gastroenteritis de etiología viral, teniendo una prevalencia de, aproximadamente, el 5% para los astrovirus clásicos (2), y de alrededor del 1.5% para los astrovirus novedosos (15). Además de generar gastroenteritis, los astrovirus se han relacionado recientemente con infecciones del sistema nervioso central en humanos (26–28,31–34,41,62), siendo VA1 el agente etiológico más frecuente, con 6 de los 11 casos identificados hasta ahora. A pesar de haber pocos casos de encefalitis diagnosticadas con astrovirus, el número podría ser mayor, ya que la etiología de un 60% de los casos de encefalitis agudas permanece no diagnosticada (181).

Se ha reportado que el sistema ubiquitina proteasoma es necesario para la replicación de otros virus de RNA de polaridad positiva (182,183). Recientemente, se demostró que este sistema es necesario para la replicación del astrovirus clásico HAstV-8 (178). Por lo anterior, estudiar este sistema a lo largo del ciclo replicativo del astrovirus VA1 sería importante para empezar a comprender la manera en la que el virus interactúa con la célula, además de caracterizar de mejor manera las etapas del ciclo y ver en qué punto toma control del sistema ubiquitina proteasoma para su beneficio. Además de la información que se puede obtener sobre el ciclo replicativo, algunas drogas que se usan para inhibir al proteasoma podrían servir como herramienta terapéutica para tratar las afecciones causadas por este virus, teniendo como candidata a la droga bortezomib, la cual ha sido aprobada para su uso en humanos por la Agencia de Medicamentos y Alimentación (FDA por sus siglas en inglés) en los Estados Unidos.

4. Hipótesis

El proteasoma es requerido durante el ciclo replicativo del astrovirus humano VA1.

5. Objetivo General

Determinar si el proteasoma es necesario en el ciclo de replicación del astrovirus humano no clásico, VA1.

5.1 Objetivos específicos

1. Determinar si la actividad del proteasoma se requiere para la producción de progenie y proteínas virales.
2. Establecer el o los eventos del ciclo replicativo en los que esté involucrado el proteasoma.

6. Material y métodos

6.1 Células, virus y reactivos

Las células C2Bbe1 son una clona de CaCo2, las cuales presentan una mayor homogeneidad morfológica y una localización apical en las vellosidades. Estas células forman una monocapa polarizada con un borde de cepillo apical morfológicamente comparable al del colon humano. Debido a estas características se eligieron estas células para realizar nuestros experimentos. Las células C2Bbe1 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y se propagaron en una atmósfera con CO₂ al 10% a 37 °C en medio de Eagle modificado por Dulbecco avanzado (Advanced DMEM) (número de catálogo 12491023; Gibco Life Technologies) suplementado con aminoácidos no esenciales y 5% de suero fetal bovino. El astrovirus VA1 fue donado por el laboratorio del doctor David Wang del Departamento de Patología e Inmunología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington en Saint Louis. Los inhibidores del proteasoma MG132 (Cat. 474790), y bortezomib, también conocido como Velcade (Cat. 217785), fueron comprados a Calbiochem y Santa Cruz Biotechnology, respectivamente.

6.2 Anticuerpos

El anticuerpo policlonal anti-ratón (hecho en cabra y conjugado a peroxidasa de rábano) se obtuvo de Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA). El anticuerpo monoclonal anti-tubulina (clona TU-01) de Invitrogen (Cat. 138000). Los anticuerpos secundarios acoplados a alexa-647 y 488 fueron de Molecular Probes (Cat. A32733 y Cat. A11094). El anticuerpo monoclonal 2A2, hecho en ratón y dirigido contra la partícula viral completa, así como los anticuerpos policlonales hechos en conejo contra la proteasa viral (anti-proteasa) y, las proteínas estructurales del virus (C45), y los hechos en ratón contra la partícula viral, se produjeron en nuestro laboratorio.

6.3 Ensayos de infección con los inhibidores del proteasoma

Células C2Bbe1 se crecieron hasta llegar a la confluencia en placas de 96 pozos en un volumen de 150 µl. Posteriormente se lavaron una vez con 100 µl de medio MEM (Minimum Essential Medium) (Invitrogen) y se infectaron con VA1 a diferentes MOI (Multiplicidad de infección) según se indique, en un volumen de 50 µl por 1 hora a 37 °C. Después de este tiempo se hicieron dos lavados con 100 µl de MEM y se agregó 150 µl de medio D-MEM suplementado con aminoácidos no esenciales 1X. Cuando fue necesario se agregaron las drogas a las concentraciones y tiempos indicados. Las células se colectaron a los tiempos indicados y se lisaron mediante tres ciclos de congelamiento y descongelamiento. Posteriormente, se calculó el título viral mediante un ensayo de focos infecciosos por inmunoperoxidasa, como se indica a continuación.

6.4 Determinación del título de virus infeccioso

Células C2Bbe1 confluentes se crecieron en placas de 96 pozos, se lavaron una vez y se incubaron con 50 µl de diluciones dobles seriadas de cada lisado de células infectadas (desde 1:20 y hasta 1:40960) durante una hora a 37 °C en 10% de CO₂. Posteriormente, se lavaron e incubaron durante 48 horas con 150 µl de medio D-MEM suplementado con aminoácidos no esenciales. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y cada pozo se lavó con 100 µl de buffer de fosfatos 1X (PBS 1X), después se incubaron con 100 µl de formaldehído al 2%, diluido en PBS 1X, durante 20 minutos. Las células se lavaron tres veces con 100 µl de PBS 1X y se incubaron con 100 µl de tritón al 0.2% durante 15 minutos. Las células se lavaron 3 veces con 100 µl de PBS 1X y se incubaron con 50 µl del anticuerpo primario mAb2A2 (el cual es un anticuerpo monoclonal generado en nuestro laboratorio) diluido 1:1000 en PBS 1X durante 2 horas a 37 °C. Después de este tiempo las células se lavaron 3 veces con 100 µl de PBS 1X y se incubaron con 50 µl de proteína A conjugada con peroxidasa diluida 1:3000 en PBS 1X, durante 1 hora a 37°C. Al finalizar se realizaron 3 lavados con PBS 1X , se agregaron 50 µl del sustrato de la peroxidasa, 3-amino-9etil-carbazole (Sigma Chemicals) como se ha descrito previamente (78), y se incubó a temperatura ambiente durante unos minutos hasta que se formó un precipitado de color marrón. Las células se lavaron con agua y se dejaron secando para el conteo de focos. Se tomó la dilución en la que se contaron de 200 a 300 focos (células teñidas) y se obtuvieron las unidades formadoras de foco usando la fórmula:

Título viral = $((A \times A1) + (B \times B1) / 2) \times 5.5 \times 20$ Unidades formadoras de foco por mililitro (uff/ml).

Donde A y B representan los focos que se cuentan en cada dilución y A1 y B1 los factores de dilución de donde se contaron los focos.

6.5 Western Blot

Las células crecidas en placas de 96 pozos, infectadas o no con VA1 y tratadas con los inhibidores del proteasoma por diferentes tiempos se lisaron con 50 µl de buffer de Laemmli 1X (Tris-Cl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10% y β-mercaptoetanol 1%) por pozo y se hirvieron durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS (SDS-PAGE) al 12.5% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA) durante 1 hora a 130 mA en buffer de transferencia (CAPS 10 mM, pH 11). Posteriormente, las membranas se bloquearon con PBS 1X con 0.1% de Tween-20 y 5% de leche descremada (Carnation) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se desechó la leche y se lavó el exceso con PBS 1X con 0.1 % de Tween-20, después se incubaron las membranas con el anticuerpo primario correspondiente diluido 1:1000 en PBS-Tween-20 al 0.1% durante toda la noche a 4 °C. Se hicieron 3 lavados, cada uno de 10 minutos con PBS-Tween-20 al 0.1% y se

incubaron durante una hora con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo acoplados a Alexa 647 a una dilución 1:10000 en PBS-Tween-20 al 0.1%. Posteriormente las proteínas se detectaron en el equipo de escáner láser, Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). Como control de carga, se incubaron las membranas con un anticuerpo anti-tubulina (TU-02:sc-8035; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) durante toda la noche a 4 °C, al término se hicieron 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween-20 al 0.1% y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa 647 diluido 1:3000 por 1 hora. Las proteínas se observaron al final de este lapso en el escáner láser.

6.6 Medición de la viabilidad celular

Se retiraron los sobrenadantes de las células infectadas con VA1 y tratadas con los inhibidores del proteasoma, y se colocaron en placas de 96 pozos vacías; a cada pozo con células sin sobrenadante se le añadieron 50 µl de la solución de lisis (número de catálogo L2152; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluida 1:10 en DMEM sin suero, y se incubó por 1 hora a 37 °C, después se colectaron los lisados y se colocaron en diferentes pozos de la placa donde se pusieron los sobrenadantes. Las muestras se almacenaron a -70 °C. Para realizar el ensayo de LDH, las muestras se descongelaron y se tomó 50 µl de cada sobrenadante y 50 µl de las células lisadas previamente diluidas 1:5 en medio DMEM sin suero. A cada muestra y a un control de medio DMEM se le adicionaron 50 µl de la mezcla del ensayo de LDH, la cual se preparó con volúmenes iguales de la solución sustrato (número de catálogo L2402; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), la solución colorante (número de catálogo L2277; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y de la preparación 1X del cofactor. Las muestras se incubaron con la mezcla del ensayo de LDH a temperatura ambiente por 20 a 30 minutos cubiertas de la luz. La reacción se detuvo agregando un volumen de 1/10 de HCl 0.1 N a cada pozo y se midió la absorbancia de cada muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

Para calcular el porcentaje de LDH total en el medio, a cada valor se le restó la lectura a 690 nm de su fondo, posteriormente se utilizó la fórmula:

$(\text{LDH en el sobrenadante} / X) (100).$

Donde X es la cantidad de LDH total y se obtuvo con la fórmula:

$(\text{LDH en el lisado celular}) (5) + \text{LDH en el sobrenadante}.$

6.7 Inmunofluorescencia

Se crecieron células C2Bbe1 hasta llegar a la confluencia en cubreobjetos colocados en los pozos de una placa de 48 pozos. Una vez confluentes, las células se infectaron con astrovirus VA1 a una MOI de 1, con o sin los inhibidores del proteasoma. A las 24 horas después de la infección, en cada pozo, las células se fijaron con 250 µl de

paraformaldehído al 2%, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se hicieron 3 lavados, cada uno con 250 μ l de PBS-NH₄Cl 50 mM. Después, las células se permeabilizaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con 250 μ l de tritón diluido al 0.2% en PBS- NH₄Cl 50 mM con albúmina sérica bovina (BSA) al 1%. Se hicieron 3 lavados con 250 μ l de PBS-NH₄Cl 50 mM, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 μ l del anticuerpo 2A2 diluido 1:1000 en PBS-NH₄Cl 50 mM con BSA al 1%. Al finalizar, se hicieron 3 lavados con PBS-NH₄Cl 50 mM y se incubó durante 5 minutos, este paso se repitió otras 2 veces. Después, se agregaron 100 μ l del anticuerpo secundario, anti-ratón acoplado a Alexa 488, diluido 1:1000 en PBS-NH₄Cl 50 mM con BSA al 1%, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación se lavó 3 veces con PBS-NH₄Cl 50 mM, y después del último lavado se añadieron 250 μ l de DAPI 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, se lavó 3 veces incubando por 5 minutos después del último lavado, repitiendo esto 2 veces más. Los cubreobjetos se sacaron con cuidado de los pozos y se montaron en un portaobjetos con 3 μ l del medio de montaje CitiFluor AF1 (Electron Microscopy Sciences). Posteriormente, se capturaron imágenes de los campos de las células infectadas tratadas con las diferentes condiciones, y se utilizó el programa ImageJ para cuantificar.

6.8 Análisis estadístico de los datos

Para realizar los análisis estadísticos de los ensayos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar 2 grupos con el programa GraphPad Prism 8. Los asteriscos mostrados en las gráficas representan los diferentes grados de significancia estadística: *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.01 y ****=p<0.001.

7.Resultados

7.1 Los inhibidores del proteasoma reducen la producción de progenie viral y la expresión de la proteína de cápside de manera dependiente de la dosis

Para determinar el efecto que tiene inhibir el proteasoma sobre el ciclo replicativo de astrovirus VA1, a células C2Bbe1 infectadas a una MOI de 1 se les añadieron los inhibidores del proteasoma MG132 y bortezomib a concentraciones de 0.1, 0.3 y 1 μ M durante 48 horas. Después de este tiempo, las células se colectaron y se evaluó el título viral mediante un ensayo de formación de focos (Fig. 6A). Se observó una disminución del título dependiente de la dosis con ambas drogas en comparación con el control, siendo el título 2.9 y 1.78 logaritmos más bajo en la dosis más alta (1 μ M) de MG132 y bortezomib, respectivamente. Para obtener más información sobre la etapa del ciclo replicativo viral afectada por la inhibición del proteasoma, se evaluó el efecto de las drogas en la expresión de las proteínas estructurales del virus mediante western blot utilizando un anticuerpo policlonal α -VA1 (hecho contra la partícula viral completa), el cual reconoce una banda precursora de las proteínas de la cápside de alrededor de 89 kDa y una banda producto del procesamiento intracelular del precursor con un peso que se encuentra alrededor de los 34 kDa, y que correspondería al *core* de la cápside. La detección del precursor de 89 kDa se observó con ambas drogas en todas las concentraciones probadas; sin embargo, detectamos una disminución evidente de su procesamiento (Fig. 6B). Al utilizar las drogas por 48 horas, la viabilidad de las células fue afectada, ya que al medir la LDH del medio (Fig. 6C) hubo diferencias significativas en casi todas las dosis de MG132 y bortezomib con respecto al control.

Estos resultados indicarían que la disminución en la expresión de las proteínas estructurales cuando se inhibe el proteasoma durante 48 horas contribuiría a la reducción del título viral, aunque también podría deberse a que utilizar las drogas por este tiempo resulta ser tóxico para las células, y que una disminución en la cantidad de células viables significa tener un título viral menor.

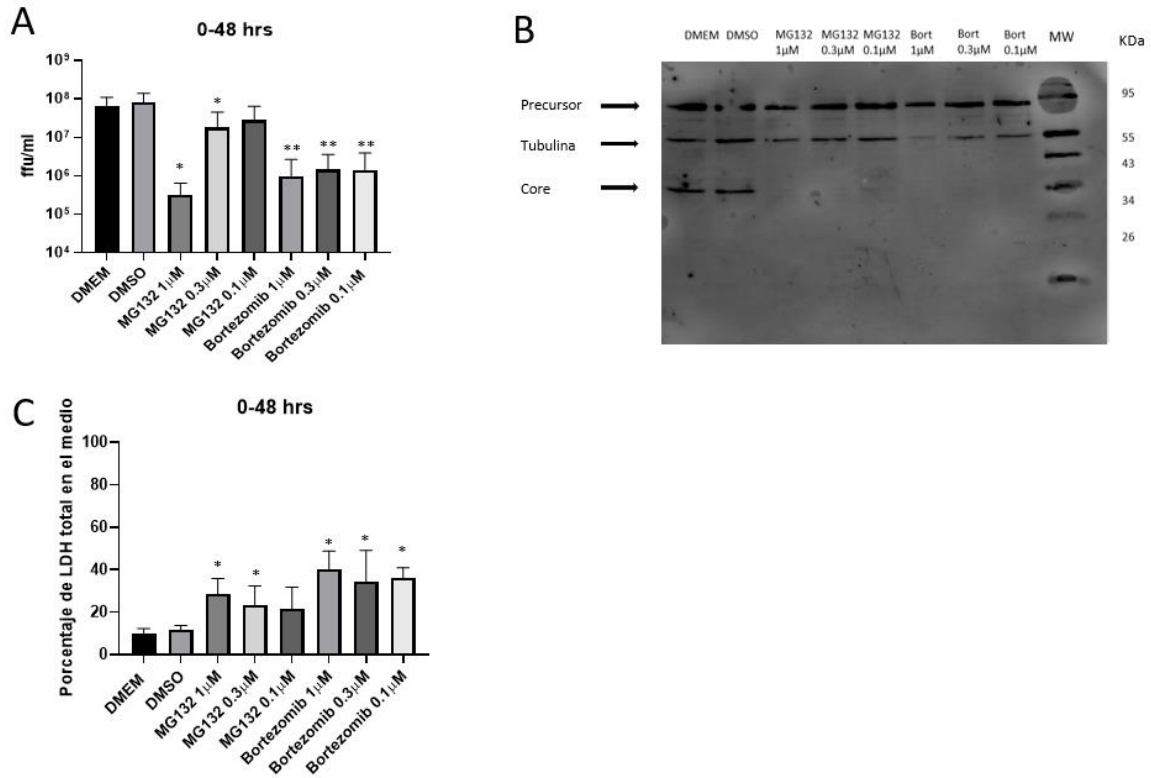


Figura 6. Efecto de los inhibidores del proteasoma sobre la producción de progenie y proteínas estructurales de VA1. Células C2Bbe1 fueron infectadas con astrovirus VA1 a una MOI de 1. Al finalizar el periodo de adsorción, las células se lavaron y se agregó el medio de cultivo con o sin DMSO como control, además del medio con las drogas inhibitoras del proteasoma, MG132 o bortezomib a concentraciones de 1, 0.3 y 0.1 μ M por 48. A) Título viral total (de virus asociados a las células y al sobrenadante) se determinó por ensayo de focos infecciosos por inmunoperoxidasa. Los datos representan las medias aritméticas expresadas como unidades formadoras de foco (ffu) por mililitro, las barras de error representan las desviaciones estándar de los resultados de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. B) Detección del precursor de la proteína de cápside y de la proteína madura mediante western blot. C) Ensayo de citotoxicidad medida mediante la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa. Los datos son expresados como el porcentaje de LDH en el sobrenadante con respecto a la LDH total (LDH del sobrenadante más LDH de las células) y representan las medias aritméticas \pm las desviaciones estándar de las medias de los resultados de 2 experimentos independientes realizados por duplicado. **= $p < 0.01$; *= $p < 0.05$.

7.2 La inhibición del proteasoma durante las primeras 24 horas del ciclo viral reduce la replicación del virus

Debido a que el tratamiento con las drogas durante 48 horas resultó ser tóxico para las células, el tratamiento con MG132 y bortezomib se redujo a 24 horas después de la infección (hpi), tiempo en el que se cosecharon las células. Alternativamente, las drogas se agregaron a las 24 hpi y se mantuvieron hasta las 48 hpi, el diseño del experimento se muestra en la figura 7. Cuando se utilizaron las drogas durante las primeras 24 horas del ciclo, el título viral total disminuyó de manera dosis dependiente comparado con el control (Fig. 8 A), siendo esta disminución de 3.99 y de 2.18 logaritmos en la dosis más alta de

MG132 y bortezomib, respectivamente. En el caso de la producción de proteínas estructurales, también se observó una disminución dependiente de la dosis tanto de la proteína precursora como de las procesadas (Fig. 8 E y F). Cuando las drogas se utilizaron de 24 a 48 hpi, el título disminuyó 0.69 y 0.39 logaritmos en la dosis más alta de MG132 y bortezomib, respectivamente, comparado con el control (Fig. 8 C). Con relación a la producción de proteínas estructurales, encontramos que en presencia de las drogas el procesamiento de la cápside se redujo al usar las dosis más altas de ambas drogas (Fig. 8 G y H). Utilizar las drogas por 24 hrs no disminuyó la viabilidad celular en la mayoría de las dosis, únicamente hubo un incremento significativo de la cantidad de LDH en el medio con respecto al total al utilizar la dosis de 0.3 μ M de MG132 en el ensayo de 0-24 horas (Fig. 8 B).

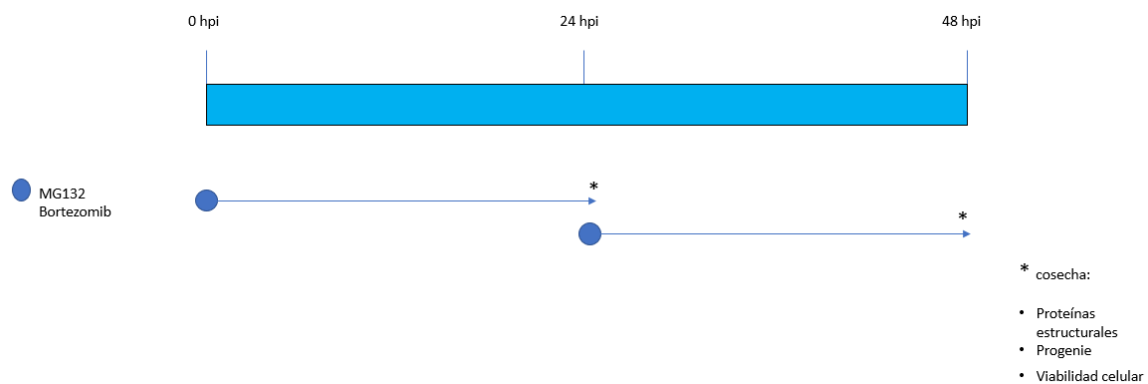


Figura 7. Esquema del experimento de infección utilizando las drogas por intervalos de 24 horas. Células C2Bbe1 se infectaron con VA1 a una MOI de 1, la adición de las drogas a diferentes concentraciones, indicada con un punto azul, se realizó inmediatamente después del periodo de adsorción y a las 24 horas después del periodo de adsorción, cosechando las células a las 24 y 48 hpi, respectivamente, como se indica por la punta de flecha. Posteriormente, se evaluó lo que sucedía con las proteínas virales, progenie viral y viabilidad celular en estas muestras (*).

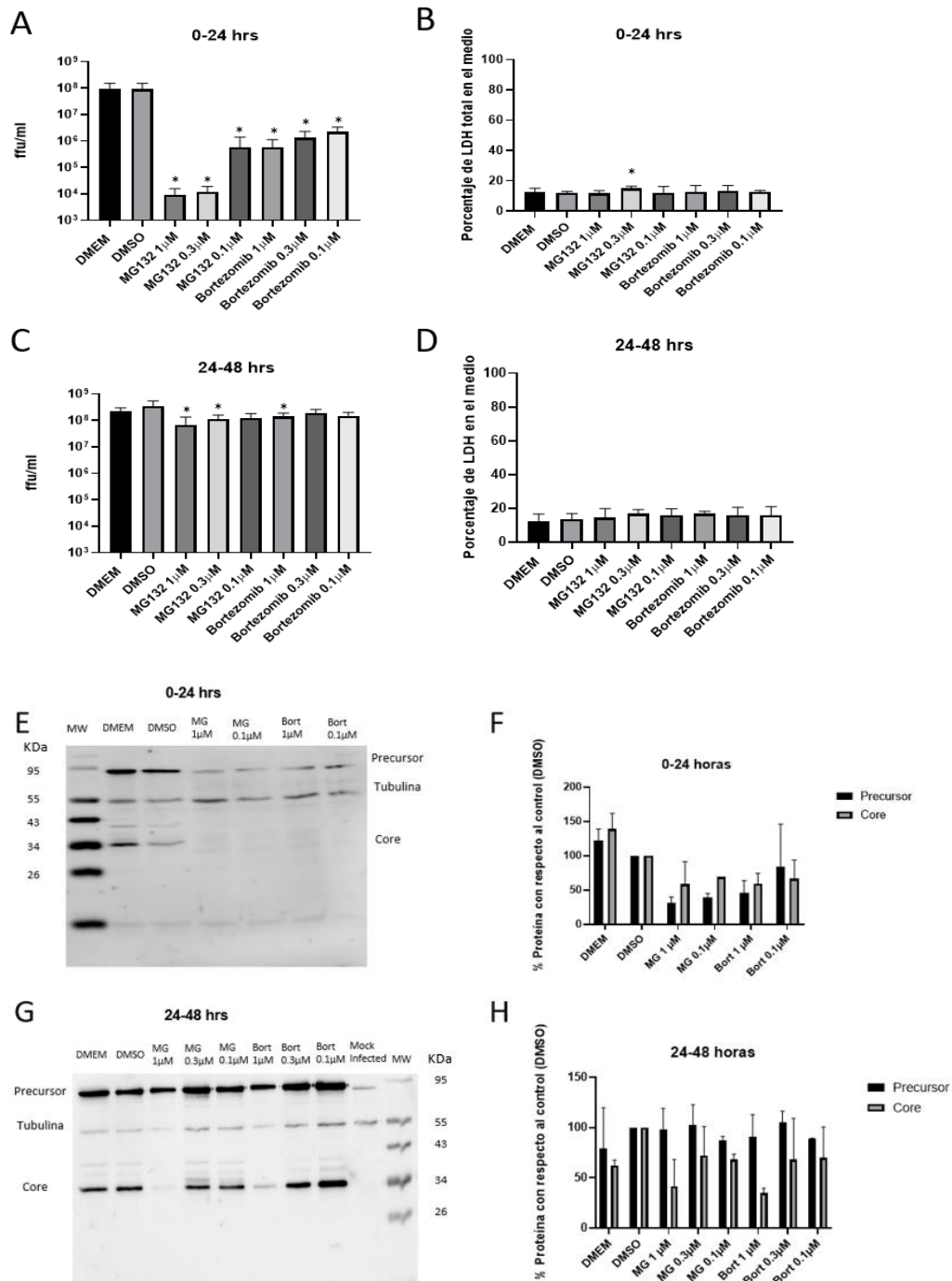


Figura 8. Los inhibidores del proteasoma reducen la replicación viral. Células C2Bbe1 sin infectar (mock) o infectadas con astrovirus VA1 a una MOI de 1 en presencia de DMSO o de las drogas MG132 y bortezomib en concentraciones de 1, 0.3 y 0.1 μM. A) y C) Titulo viral. Los datos representan las medias aritméticas expresados como unidades formadoras de foco (ffu) por mililitro, las barras de error representan las desviaciones estándar de 2 (A) y 3 (C) experimentos independientes realizados por duplicado. B) y D) Citotoxicidad utilizando las drogas por 24 horas. Los datos son expresados como el porcentaje de LDH en el sobrenadante con respecto a la LDH total (LDH del sobrenadante más LDH de las células) y representan las

medias aritméticas, las barras de error representan las desviaciones estándar de los resultados de 2 (B) y 3 (D) experimentos independientes realizados por duplicado. $*=p<0.05$. E) y G) Imágenes de Western blot de las proteínas estructurales del virus de los experimentos en los que se utilizaron las drogas por diferentes tiempos de tratamiento durante el ciclo. F) y H) Cuantificaciones de las muestras tratadas con los inhibidores del proteasoma por los tiempos indicados. Las barras de error representan las desviaciones estándar de los resultados de 2 experimentos independientes.

7.3 Inhibir el proteasoma con MG132 y bortezomib durante la infección reduce la producción de proteínas no estructurales.

Para determinar el efecto de la inhibición del proteasoma sobre la expresión de las proteínas no estructurales y para caracterizar el efecto que tienen las drogas durante las primeras 24 horas del ciclo replicativo viral, células C2Bbe1 se infectaron con astrovirus VA 1 a una MOI de 10, después del periodo de adsorción se agregaron diferentes dosis de las drogas MG132 y bortezomib, las cuales se mantuvieron hasta las 24 horas, tiempo en el que se determinó la producción viral. Cuando se utilizó MG132 se observó una disminución del título viral dependiente de la dosis, a partir de 33 nM, con una disminución del título de 0.88 logaritmos con respecto al control; la dosis en la que se observó la máxima reducción del título viral fue de 1 μ M, con una disminución de 4.39 logaritmos con respecto al control (Fig. 9A). Para bortezomib también se observó una disminución del título viral de manera dosis dependiente, aunque ésta fue mucho menor comparada con la observada cuando se utilizó MG132, teniendo una disminución de 1.36 logaritmos con respecto al control para la dosis más baja (0.1 μ M) y de 1.884 logaritmos para la dosis más alta (0.3 μ M) (Fig. 9F). Para evaluar el efecto de las drogas sobre la expresión de las proteínas estructurales se utilizó el anticuerpo policlonal C45 en lugar del α -VA1, debido a que contábamos con poca cantidad de este último y a que C45 reconoce a varios productos del procesamiento del precursor. C45 fue generado contra una proteína recombinante que corresponde al *core* de la cápside y detecta a la proteína precursora de 89 kDa y a dos bandas de 36 y 34 kDa, aproximadamente, que corresponderían al *precore* y al *core*. Para la detección de las proteínas no estructurales, se utilizó un anticuerpo contra la proteasa viral que reconoce una banda precursora de alrededor de 79 kDa y una banda procesada de aproximadamente 25.5 kDa. Al evaluar el efecto de MG132 sobre las proteínas estructurales, se observó una marcada disminución en el precursor a partir de la dosis de 0.1 μ M, mientras que para el *core* y *precore* la disminución se observó a partir de la dosis más baja del fármaco (Fig. 9B y C).

Cuando se utilizó bortezomib, al igual que en MG132, se observó una disminución dependiente de la dosis en el *core* y *precore* a partir de 3 nM, mientras que la disminución en el precursor no fue tan evidente como cuando se utilizó MG132 (Fig. 9G y H).

Al evaluar la expresión de la proteasa viral, tanto para MG132 como para bortezomib, el precursor parece estar ligeramente reducido, mientras que el procesamiento de la proteasa disminuyó de manera dosis-dependiente en ambos casos (Figs. 9D, E, I y J).

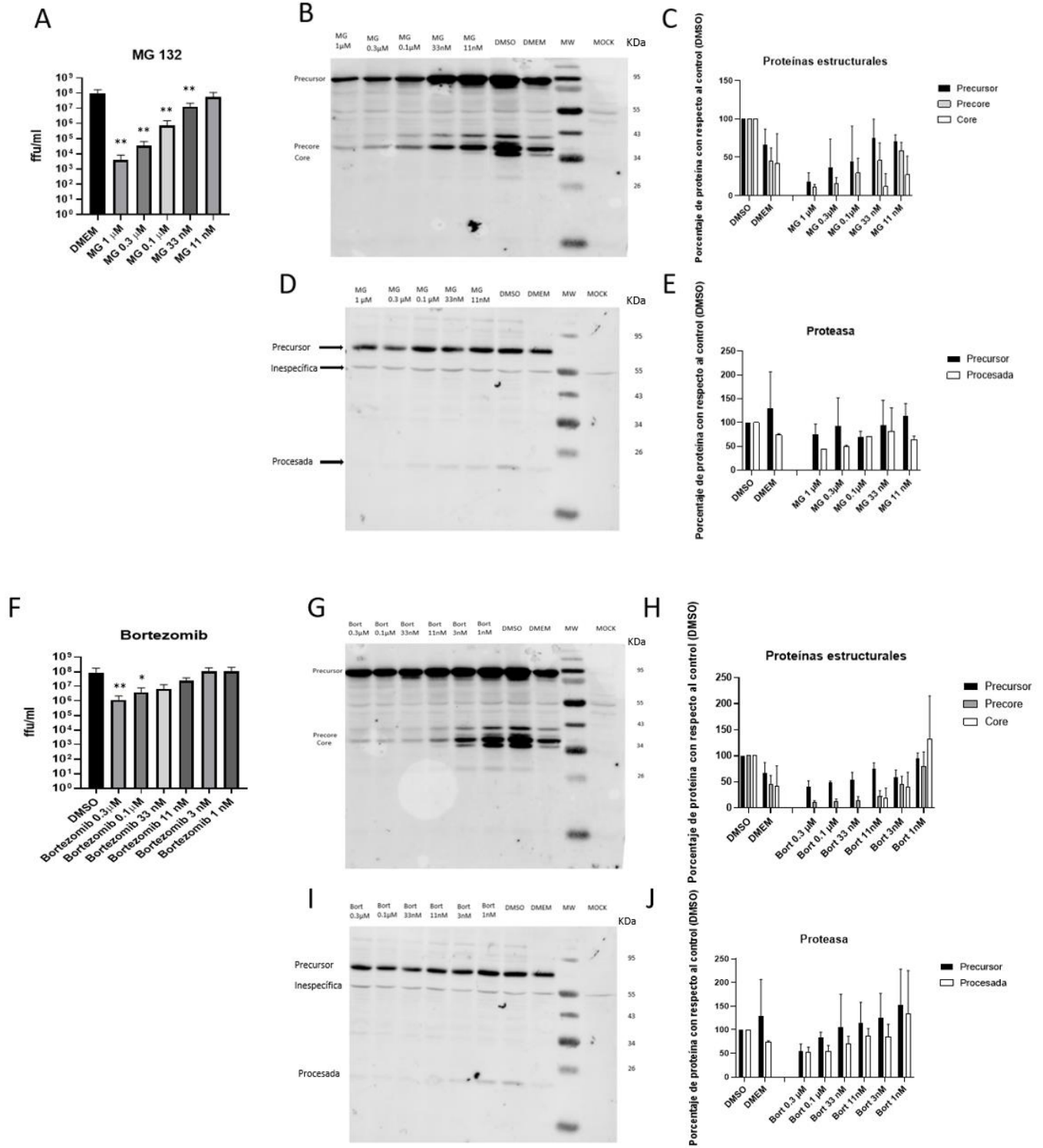


Figura 9. Efecto de MG132 y bortezomib sobre la producción de partículas de VA1 y de las proteínas estructurales y no estructurales. Células C2Bbe1 fueron infectadas con astrovirus VA1 a una MOI de 10. Al terminar el periodo de adsorción las células fueron lavadas y se agregaron las drogas a concentraciones de 11 nM, 33 nM, 0.1 μ M, 0.3 μ M y 1 μ M en el caso de MG132, y de 1 nM, 3 nM, 11 nM, 33 nM, 0.1 μ M y 0.3 μ M para bortezomib. Las drogas se mantuvieron durante 24 horas y después de este tiempo las células fueron

cosechadas. A y F) Título viral calculado mediante un ensayo de focos infecciosos por inmunoperoxidasa. Los datos representan las medias aritméticas expresadas como unidades formadoras de foco (ffu) por mililitro, las barras de error representan las desviaciones estándar de los resultados de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. **= $p < 0.01$, *= $p < 0.05$. Imágenes de los western blots en los que se utilizaron el suero C45, que reconoce las proteínas estructurales del virus (B y G) y el suero anti-proteasa (D e I). Cuantificaciones de las proteínas, donde el control (DMSO) se tomó como el 100% y la banda inespecífica que reconoce el suero anti-proteasa se utilizó como control de carga (C, E, H y J). Las barras de error representan las desviaciones estándar de los resultados de 2 experimentos independientes.

7.4 La expresión de proteínas virales se observa a partir de las 12 horas y requiere de un proteasoma activo para su expresión y procesamiento

Para caracterizar lo que sucede a lo largo del ciclo viral y en qué tiempo del ciclo es necesario el proteasoma, los fármacos MG132 y bortezomib se utilizaron por intervalos de 12 horas durante todo el ciclo, se cosecharon las células después de cada intervalo y se evaluó lo que sucedía con la progenie viral y las proteínas estructurales; el diseño del experimento se muestra en la figura 10.

Cuando se inhibió el proteasoma durante las primeras 12 horas del ciclo con MG132, hubo una disminución del título viral de 1.36 logaritmos con respecto al control, y de 0.96 logaritmos cuando se usó bortezomib. Durante este periodo el título viral en el control aún es bajo, siendo de 1.26×10^4 ffu/ml. Cuando se utilizó bortezomib de 12 a 24 horas se observó una disminución del título viral de 0.76 logaritmos con respecto al control, mientras que MG132 no tuvo ningún efecto. En este punto el título viral se acerca a su máximo (2.2×10^7 ffu/ml), comparado con lo que sucede a las 36 y 48 horas donde prácticamente ya no hay diferencias. Cuando ambas drogas se utilizaron en los intervalos que comprenden de las 24 a las 36 horas y de 36 a 48 horas, no hubo efecto sobre el título viral (Figura 11 A). Con relación a la expresión de las proteínas estructurales, durante las primeras 12 horas del ciclo se detecta poca producción de proteína precursora en el control, la cual se redujo significativamente en presencia de ambas drogas; en este punto no se detectaron los productos del procesamiento. A las 24 horas hubo un incremento notable en la expresión de la proteína precursora en las condiciones control, la cual no fue afectada por ninguna de las drogas cuando se utilizaron de 12 a 24 horas, en este tiempo se observó la expresión del *core* y el *precore*, y una reducción en la expresión de ambos cuando se utilizó bortezomib, mientras que cuando se utilizó MG132 sólo disminuyó la expresión del *core*. Al utilizar las drogas de 24 a 36 horas y de 36 a 48 horas no hubo una disminución en la expresión de las proteínas con respecto al control (figura 11 B y C). Estos resultados nos indican que el proteasoma probablemente tenga un papel durante las primeras 12 horas del ciclo replicativo.

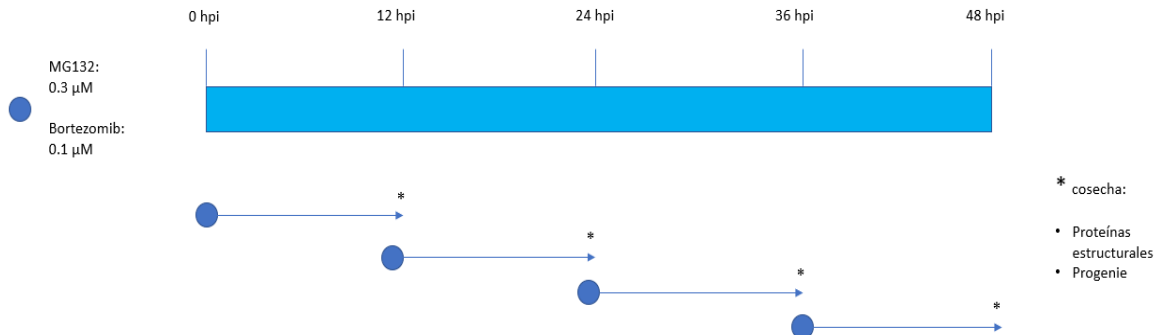


Figura 10. Esquema de la cinética de infección utilizando las drogas por intervalos de 12 horas durante 48 horas. Células C2Bbe1 fueron infectadas con VA1 a una MOI de 10, MG132 y bortezomib se añadieron a concentraciones de 0.3 μM y 0.1 μM , respectivamente, durante intervalos de 12 horas (indicado por un punto azul). Al término de cada intervalo (punta de flecha) se cosecharon las células y se evaluó lo que sucedía con la progenie viral y las proteínas estructurales (asterisco).

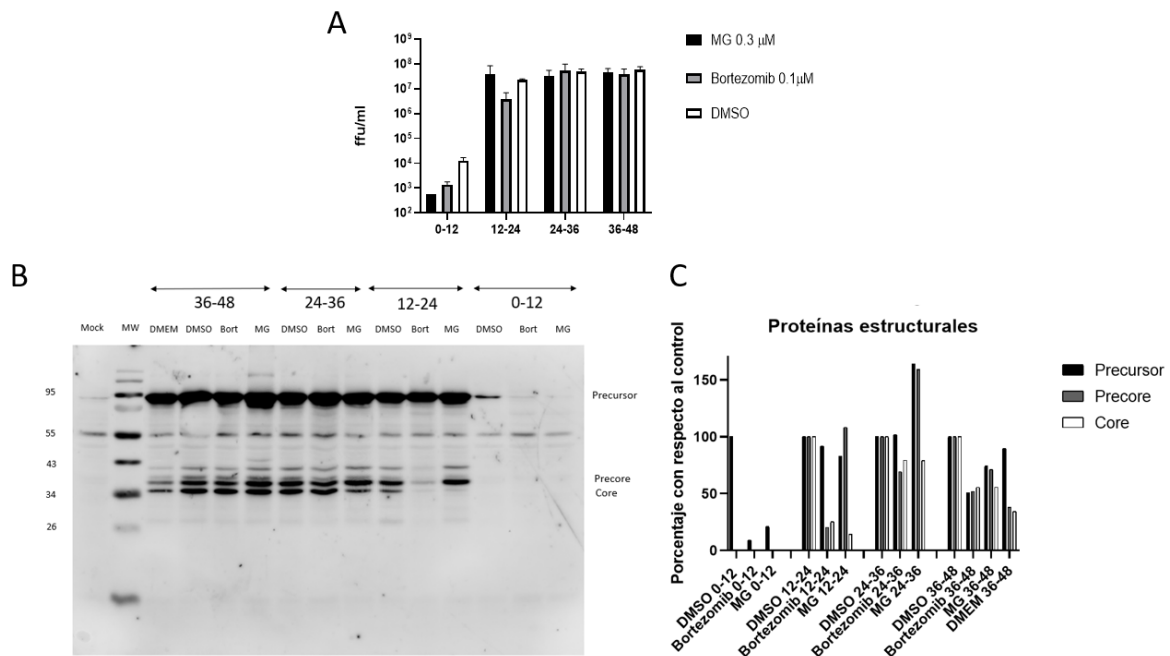


Figura 11. El proteasoma es necesario durante las primeras 24 horas del ciclo viral. Células C2Bbe1 fueron infectadas con astrovirus VA1 a una MOI de 10 y tratadas con DMSO (vehículo), MG132 o bortezomib en concentraciones de 0.3 μM y 0.1 μM , respectivamente para cada droga, por intervalos de 12 horas, al término de cada intervalo se cosecharon las células. A) Título viral. Los datos representan las medias aritméticas expresadas como unidades formadoras de foco (ffu) por mililitro, las barras de error representan las desviaciones estándar de los resultados de 1 experimento realizado por duplicado. B) Imagen del western blot utilizando el anticuerpo anti-C45. C) cuantificación de las proteínas en el western blot, donde el control (DMSO) corresponde al 100%.

7.5 Las primeras 12 horas del ciclo replicativo de VA1 requieren de un proteasoma funcional

Debido a que se observó que el ciclo viral se afecta al inhibir el proteasoma durante las primeras 24 horas y para elucidar de mejor manera lo que sucede durante este tiempo y en qué parte es necesaria esta maquinaria de degradación proteica, se realizó una cinética en la que se utilizaron las drogas por intervalos de 6 horas y las células se cosecharon a las 24 horas para evaluar la producción de la progenie viral, las proteínas estructurales y la proteasa viral. El diseño de esta cinética se muestra en la figura 12. La presencia de ambas drogas en los periodos de 0 a 6 y de 6 a 12 horas de infección, resultó en una disminución de la producción viral; En presencia de bortezomib la reducción fue de 1.1 y 0.88 logaritmos en el primer y segundo intervalos. En presencia de MG132 la disminución fue de 1.53 y 0.98 logaritmos en el primer y segundo intervalos (figura 13 A). Al analizar la producción de las proteínas estructurales se observó que cuando se usaron las drogas en los intervalos que van de las 0 a las 6 horas y de las 6 a las 12 horas, se reduce la expresión del precursor y de los productos de su procesamiento (figura 13 B y C). En esta cinética se observó que la expresión y el procesamiento de la proteasa disminuyeron cuando se inhibió el proteasoma en el intervalo que comprende de las 0 a las 6 horas del ciclo (figura 13 D y E).

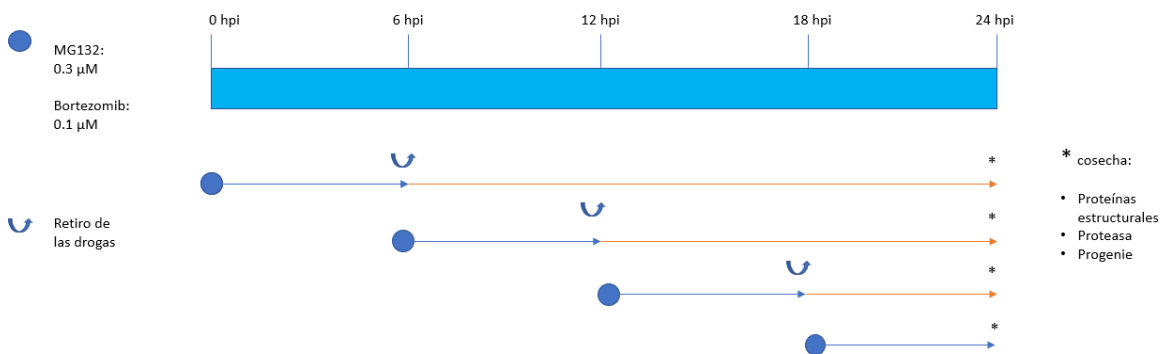


Figura 12. Esquema de la cinética de infección utilizando las drogas por intervalos de 6 horas durante 24 horas. Células C2Bbe1 fueron infectadas con VA1 a una MOI de 10, MG132 y bortezomib se añadieron a concentraciones de 0.3 µM y 0.1 µM, respectivamente, durante intervalos de 6 horas (indicado por un punto azul). Al término de cada intervalo, representado por la punta de flecha azul, las drogas fueron reemplazadas (Flecha curva) por medio fresco y la cosecha se realizó a las 24 horas (asterisco), donde se evaluó la progenie viral, las proteínas estructurales y la proteasa viral.

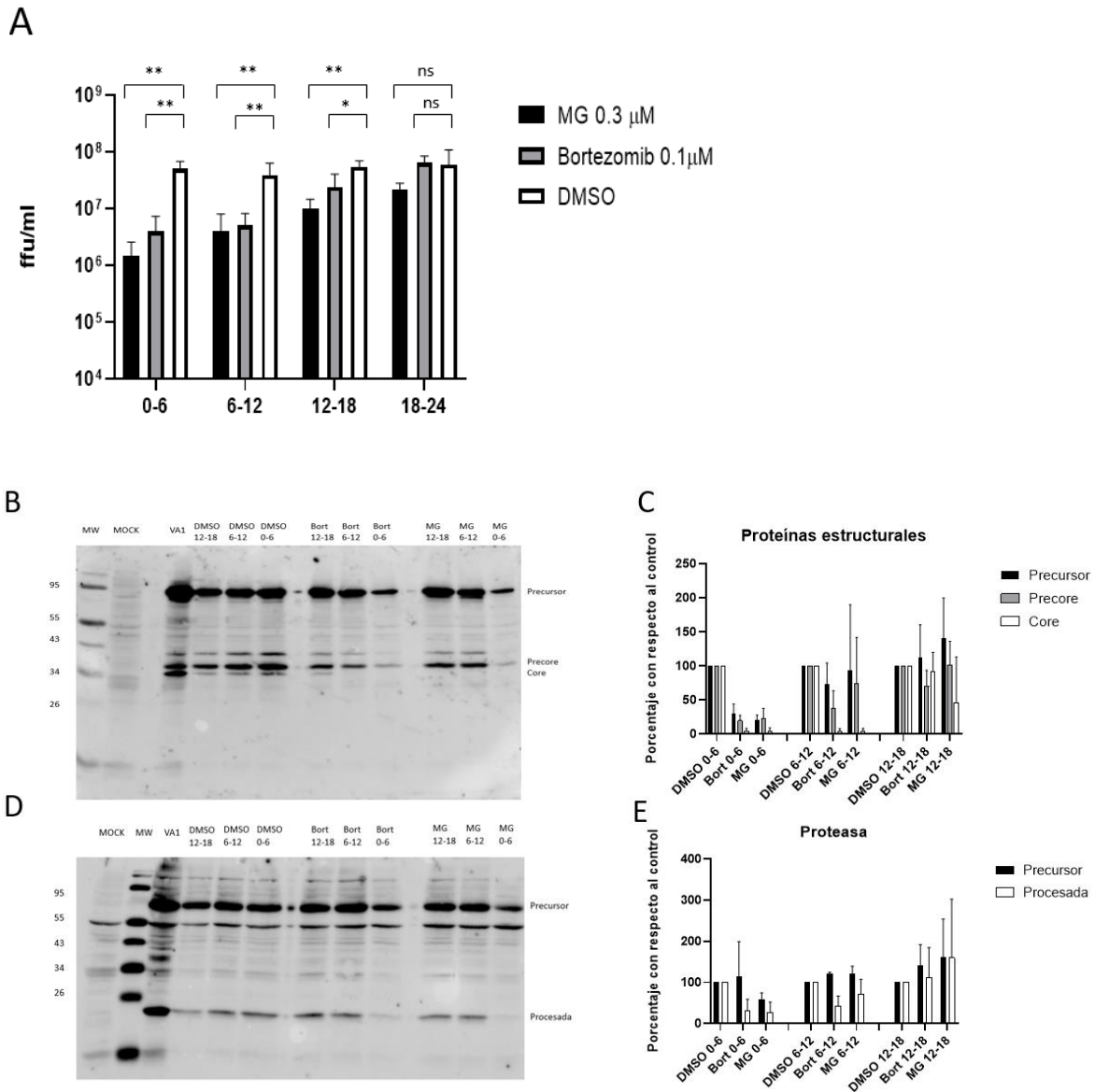


Figura 13. La importancia del proteasoma es mayor durante las primeras 12 horas del ciclo. Células C2Bbe1 fueron infectadas con astrovirus VA1 a una MOI de 10. MG132 y bortezomib se añadieron por periodos de 6 horas en concentraciones de 0.3 μ M y 0.1 μ M, respectivamente, y se cosecharon a las 24 horas. A) Título viral. Los datos representan las medias aritméticas expresados como unidades formadoras de foco (ffu) por mililitro, las barras de error representan las desviaciones estándar de los resultados de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. B) y D) Imágenes de los western blots utilizando el anticuerpo anti-C45 (B) o el anticuerpo anti-proteasa (D). C) y E) cuantificaciones de las proteínas en el western blot, donde el control (DMSO) corresponde al 100%. Las barras de error representan las desviaciones estándar de los resultados de 2 experimentos independientes.

7.6 La inhibición del proteasoma reduce la infectividad del VA1

La entrada del VA1 a la célula comprende los eventos del ciclo viral que anteceden a la primera ronda de traducción de las proteínas no estructurales. Como observamos que el proteasoma es necesario principalmente durante las primeras 12 horas del ciclo, alguno de

los eventos que comprenden la entrada podría estar siendo afectado por su inhibición. Para explorar esta suposición, células infectadas con VA1 se trataron con bortezomib de 3 maneras diferentes, como se muestra en la figura 14. Brevemente, las células fueron o no tratadas con bortezomib 1 hora antes de la infección, durante el periodo de adsorción y hasta las 6 ó 24 horas después de la infección, o bien se agregó bortezomib 6 horas después del periodo de adsorción. En todos los casos, después del período de adsorción se agregó el anticuerpo 2A2 para neutralizar al virus e impedir que siguiera entrando a la célula. Las células se fijaron a las 24 horas y el porcentaje de células infectadas se determinó mediante una inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo 2A2 que reconoce a la partícula viral completa. En presencia de bortezomib desde -1 hasta las 24 horas después de la infección hubo una disminución del 80.38% del porcentaje de células infectadas con respecto al control (figura 15, primera columna), mientras que cuando se retiró el bortezomib a las 6 hpi, se tuvo una reducción del 74.26% (figura 15, segunda columna). Por su parte, cuando se inhibió el proteasoma a partir de las 6 hpi la reducción fue del 37% (figura 15, tercera columna), sugiriendo que el proteasoma es necesario para la entrada efectiva del virus a la célula.



Figura 14. Esquema de los 3 tratamientos con bortezomib. Células C2Bbe1 fueron infectadas con astrovirus VA1 a una MOI de 1. En el tratamiento (1) Las células fueron tratadas con 0.1 μ M de bortezomib 1 hora antes de la infección (-2 hrs), durante el periodo de adsorción (-1 hrs) y hasta las 24 hpi. En (2), las células fueron tratadas 1 hora antes de la infección, durante el periodo de adsorción y hasta las 6 hpi, momento en el que se retiró la droga (flecha curva). En (3), bortezomib se agregó a partir de las 6 hpi y hasta las 24 hpi. En todos los casos el anticuerpo 2A2 se agregó después del periodo de adsorción a la concentración de 1:1000, mientras que las células fueron fijadas a las 24 hpi.

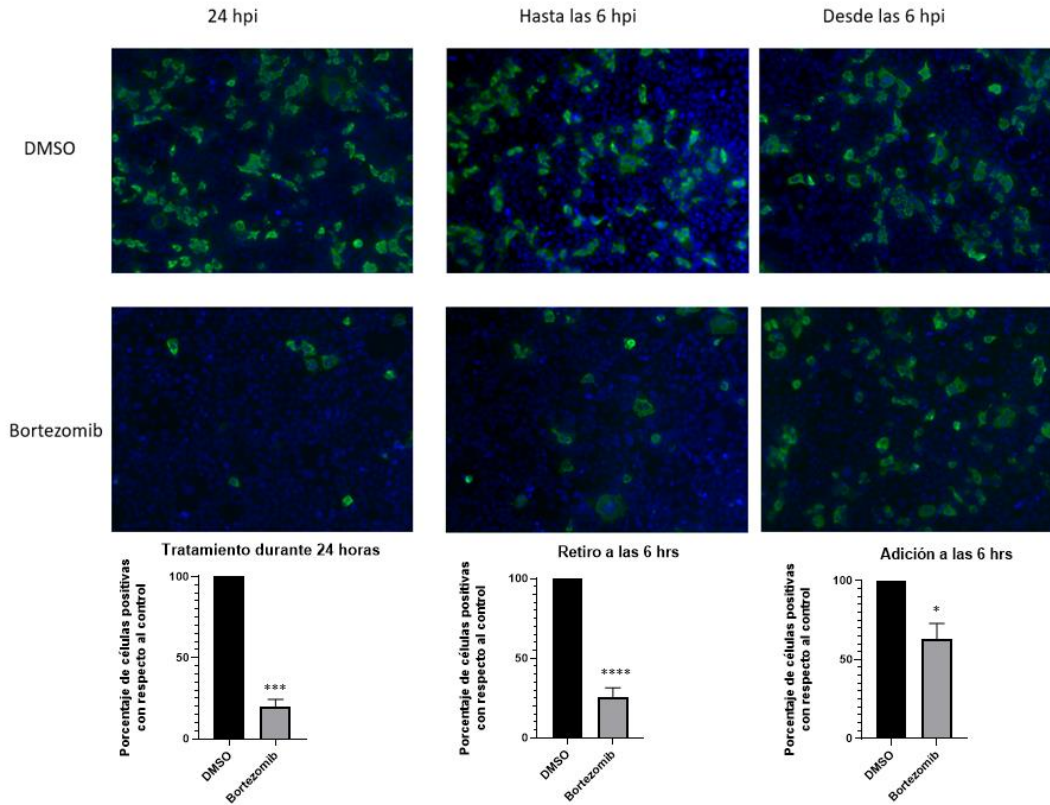


Figura 15. La inhibición del proteasoma durante las primeras 6 horas del ciclo viral afecta la infectividad del virus. Las células fueron tratadas con bortezomib e infectadas con VA1 a una MOI de 1 como se indica en la figura 14. A las 24 horas las células se fijaron y se realizó una inmunofluorescencia en la cual se utilizó el anticuerpo 2A2 (verde) para visualizar al virus y DAPI (azul) para observar el núcleo de las células. Las células infectadas y no infectadas fueron contadas con el programa ImageJ. Los resultados están expresados como el porcentaje de células infectadas del total de células que fueron tratadas con bortezomib, comparadas con el porcentaje de células infectadas del total de células tratadas con DMSO (que representa el 100%), y son las medias aritméticas con las desviaciones estándar de los resultados de 3 experimentos independientes realizados por duplicado.

8. Discusión

El proteasoma es parte del principal sistema de degradación proteica en la célula, el sistema ubiquitina-proteasoma. Este es requerido por muchos virus para favorecer su replicación. En el caso de otros virus con genoma de RNA de polaridad positiva, como en los coronavirus, inhibir el proteasoma afecta la entrada, la síntesis de RNA y la subsecuente expresión proteica del virus (184); por su parte, para el virus de la hepatitis E el proteasoma es necesario durante la transcripción y traducción del RNA viral (185). Para saber el papel que tiene el proteasoma en el ciclo replicativo del astrovirus VA1 se utilizaron las drogas MG132 y bortezomib durante todo el ciclo (48 horas). Al inhibir el proteasoma por este periodo de tiempo observamos una reducción en la progenie y proteínas estructurales del virus, lo que denota la importancia del proteasoma en el ciclo replicativo de VA1, aunque este resultado podría deberse a que el uso de las drogas por este periodo de tiempo resultó ser tóxico para las células (figura 6C). Efectos negativos sobre la viabilidad celular de líneas BHK21, HeLa y Vero-E6, se han observado en otros estudios al utilizar bortezomib y MG132, en dosis que van desde 1 μ M, por periodos de tiempo de 24 y 48 horas (186,187). En este estudio utilizar ambas drogas por 48 horas en concentraciones de 0.1, 0.3 y 1 μ M resultó ser tóxico para la línea celular C2Bbe1. Debido a esto, las células fueron tratadas por períodos de tiempo de 24 horas, lo que no afectó significativamente la viabilidad celular (figuras 8 C y F). Inhibir el proteasoma durante las primeras 24 horas del ciclo afectó en mayor medida la generación de progenie viral y la expresión de proteínas estructurales, en comparación con lo observado cuando el proteasoma se inhibió de 24 a 48 horas después de la infección (figura 8). Esto podría deberse a que a las 24 horas después de la infección el desarrollo del ciclo viral ya no depende tanto del proteasoma, por lo que su inhibición después de este tiempo lo afecta muy levemente.

Además de la producción de progenie viral y la expresión de la proteína de cápside, la expresión de la proteasa viral también resultó reducida cuando se utilizaron las drogas MG132 y bortezomib, en una manera dependiente de la dosis, durante las primeras 24 horas del ciclo (figuras 9 D e I). Aunque utilizar ambas drogas generó un efecto negativo para el virus, este fue más evidente al utilizar MG132, ya que la disminución en el título viral fue de un poco más de 2 logaritmos con respecto a la generada por bortezomib, sumado a que la expresión del precursor de la cápside disminuyó más al utilizar MG132. Esta diferencia podría deberse al hecho de que a dosis altas MG132 podría estar afectando otras proteasas, ya que también inhibe con menor afinidad calpaínas y catepsinas (136), proteasas que podrían ser necesarias para la replicación del virus y por lo tanto su inhibición estaría contribuyendo a los efectos observados. Otro factor a tomar en cuenta es que MG132 inhibe los tres tipos de actividades proteolíticas del proteosoma, mientras que bortezomib únicamente inhibe las actividades de proteasa parecidas a la caspasa y a la quimotripsina (188).

En esta primera parte del ciclo, las 12 horas iniciales requieren en mayor grado de un proteasoma funcional (figuras 11 y 13). Un efecto similar se ha observado en el ciclo replicativo del astrovirus humano clásico 8, en el que inhibir el proteasoma después del período de adsorción o a las 4 horas después de éste, se genera una disminución en la producción de progenie de más de un logaritmo con respecto al control (178).

Debido a que el proteasoma es necesario durante un tiempo temprano del ciclo replicativo de astrovirus VA1, pensamos que probablemente la entrada del virus a la célula sería una de las etapas que requieren del proteasoma para llevarse a cabo. El proceso de entrada viral es una serie de eventos complejos que pueden ser definidos como todos los procesos que culminan en la liberación del genoma viral al citoplasma para ser replicado. Algunos de los eventos incluidos en la entrada del virus incluyen la unión al receptor, la penetración de la membrana celular, el tráfico intracelular, así como la decapsidación. Para evaluar si el proteasoma es necesario durante la entrada y dado que la entrada de astrovirus VA1 no ha sido caracterizada, elegimos un tiempo putativo de entrada basándonos en evidencia previa con otros virus, el cual fue de 6 horas. Lo primero que tomamos en cuenta para escoger este tiempo fue que en la infección de VA1, la aparición del RNA de doble cadena (el cual es un indicativo de la replicación) se detecta a partir de las 12 hpi, mientras que la cápside se observa hasta las 18 hpi (176). Por otro lado, la proteasa, la cual se expresa desde la primera ronda de traducción, se observó a partir de las 12 hpi en una cinética de expresión de esta proteína viral realizada en nuestro laboratorio. Por último, sabemos que el ciclo replicativo de VA1 tiene una mayor duración comparado con el ciclo de los astrovirus clásicos, en los cuales existen más datos sobre la caracterización de la entrada del virus. Para esto se sabe que en HAstV-8 el tiempo medio de entrada es de 130 minutos (71). Con estos datos pensamos que el tiempo de entrada debería ser mayor a 2 horas y menor a 12 horas, por lo que 6 horas nos pareció un tiempo óptimo para evaluar el papel del proteasoma en la entrada de VA1. En este trabajo determinamos que el proteasoma es necesario para la infectividad del virus, ya que al inhibirlo durante las primeras 6 horas observamos una disminución en el porcentaje de células infectadas de 74.26% con respecto al control, mientras su inhibición después de este tiempo generó únicamente una reducción del 37% (figura 15). Aunque se observó una menor reducción en el porcentaje de células infectadas cuando se inhibió el proteasoma después del tiempo putativo de entrada, la disminución observada podría ser un indicativo de que el proceso de entrada dura más de 6 horas o que el proteasoma afecta un evento posterior a la entrada como, por ejemplo, la traducción. Para comprobar que el proteasoma es requerido durante la entrada del virus podría llevarse a cabo un experimento como el realizado por Aguilar et al. (72), en el cual el RNA genómico purificado sería transfectado en células permisivas tratadas con los inhibidores del proteasoma, de tal manera que si el proteasoma es necesario únicamente durante la entrada, no habría diferencias en la infección entre las células tratadas y las no tratadas.

Otros virus con genoma de RNA también requieren del proteasoma durante su entrada. Algunos lo requieren para mediar su liberación de la vía endocítica. Un ejemplo de esto es el virus de la hepatitis murina, en el cual se ha visto que en presencia de MG132 su RNA genómico co-sedimenta con Rab5 (un marcador de endosomas tempranos), y con marcadores lisosomales, lo que sugeriría que en ausencia de actividad proteasomal, el ciclo replicativo es abortado y el virus es dirigido hacia los lisosomas para su degradación (189). De manera similar, MG132 y lactacistina bloquean la entrada del virus de la encefalitis japonesa, en el cual inhibir el proteasoma genera que las partículas virales co-localicen con lisosomas (190). La actividad del proteasoma también es importante durante la entrada del virus de la influenza A, ya que en presencia de MG132, el virus es arrestado en la vecindad de endosomas tardíos (191). El proteasoma también está involucrado en la decapsidación o liberación del genoma de varios virus. La degradación de la cápside del virus del dengue es retrasada cuando se utiliza MG132 lo que fue visualizado por medio de western blot de las proteínas de cápside (192). Sin embargo, la liberación del RNA del virión no se afecta por la inhibición del proteasoma. La inhibición de la ubiquitinación también retrasa la degradación de la cápside y afecta la liberación del RNA. Esto sugiere que la degradación de la cápside es dependiente de la ubiquitinación y del proteasoma, pero que la liberación del RNA solamente requiere de la ubiquitinación (193).

La disminución en la infectividad al tratar con bortezomib después del tiempo putativo de entrada podría deberse a que el proteasoma es necesario durante otro evento del ciclo. Otros virus con genoma de RNA, como los virus de la hepatitis A y C y el virus del mosaico amarillo del nabo (182,194,195), utilizan la degradación mediada por proteasoma para disminuir los niveles de la RdRp, lo que podría deberse a que bajas cantidades de la RdRp sean requeridas para regular el cambio entre la síntesis de la cadena negativa y la cadena positiva del RNA viral durante la replicación (194). También es posible que mantener una baja concentración de RdRp sea una estrategia del virus para preservar la integridad de su genoma, o que mantener una cantidad baja de proteínas virales le permita al virus escapar de la vigilancia del sistema inmune del huésped (194). Para evaluar si la RdRp del astrovirus VA1 necesita ser degradada por el proteasoma durante el ciclo, podría llevarse a cabo un experimento de pulso y caza de la RdRp utilizando los inhibidores del proteasoma, para esto un anticuerpo que reconozca la RdRp del virus y dé una buena señal por western blot necesita ser generado.

Las proteasas codificadas por los virus son requeridas para la replicación viral exitosa mediante el corte de los precursores de las poliproteínas y la supresión de la transcripción y traducción de las proteínas del huésped (196,197). Existe la posibilidad de que los efectos observados en este trabajo sean debidos a que MG132 también inhibe a la proteasa de VA1. Esto se apoya en el hecho de que MG132 tiene actividad contra varios blancos no específicos (136), además de que la proteasa de VA1 es una serina proteasa y el proteasoma una treonina proteasa por lo que comparten varias características como el nucleófilo del sitio activo y una base general, que son regularmente los blancos de los

inhibidores irreversibles (198). Por último, saquinavir, un inhibidor de la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana-1, también inhibe al proteasoma (199). Esto podría ser evaluado mediante un estudio *in vitro* de la actividad de la proteasa en presencia de MG132.

La inhibición del proteasoma resulta en la acumulación de proteínas ubiquitinadas, lo que disminuye la disponibilidad de ubiquitina libre, por lo que los resultados observados en este trabajo podrían deberse en parte a la falta de ubiquitinación. Drogas que inhiban la reacción de ubiquitinación, como Pyr41, o siRNAs que disminuyan la expresión de la ubiquitina podrían ser utilizados para evaluar si la ubiquitinación es necesaria durante el ciclo replicativo de VA1.

En este trabajo determinamos que el proteosoma es necesario principalmente durante una etapa temprana del ciclo replicativo de VA1, por lo que los inhibidores del proteosoma serían una alternativa para el tratamiento de los signos ocasionados por la infección del sistema nervioso central del astrovirus VA1, teniendo en cuenta que bortezomib ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de otras enfermedades y que el desarrollo de inhibidores del proteosoma de nueva generación que superen las limitaciones de bortezomib se está llevando a cabo.

9. Conclusiones

1. El proteasoma participa en el ciclo replicativo de VA1.
2. El proteasoma es requerido principalmente durante las primeras 12 horas del ciclo replicativo de VA1.

10. Perspectivas

- ❖ Determinar si la entrada requiere de la actividad del proteasoma mediante la purificación y transfección en células permisivas del RNA genómico de VA1 en presencia de los inhibidores del proteasoma.
- ❖ Caracterizar el tiempo de entrada del astrovirus VA1 a la célula.
- ❖ Investigar en qué fase de la entrada está involucrado el proteasoma.
- ❖ Evaluar si algún otro evento del ciclo posterior a la entrada requiere del proteasoma para llevarse a cabo.
- ❖ Demostrar si la ubiquitinación está involucrada en los efectos observados por la inhibición de la degradación proteasomal.

11. Referencias

1. Bosch A, Pintó RM, Guix S. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2014 Oct [cited 2019 Oct 8];27(4):1048–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278582>
2. Vu DL, Bosch A, Pintó RM, Guix S. Epidemiology of classic and novel human astrovirus: Gastroenteritis and beyond. *Viruses*. 2017;9(2):1–23.
3. Ren D, Li T, Zhang X, Yao X, Gao W, Xie Q, et al. OASL Triggered by Novel Goose Astrovirus via ORF2 Restricts Its Replication. *J Virol* [Internet]. 2020 Nov 23 [cited 2021 Sep 23];94(24). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32967952/>
4. Cordey S, Vu DL, Zanella MC, Turin L, Mamin A, Kaiser L. Novel and classical human astroviruses in stool and cerebrospinal fluid: comprehensive screening in a tertiary care hospital, Switzerland. *Emerg Microbes Infect*. 2017 Sep 20;6(9):e84.
5. Appleton H, Higgins PG. VIRUSES AND GASTROENTERITIS IN INFANTS. Vol. 305, *The Lancet*. 1975. p. 1297.
6. Mendez E, Arias C. Astroviruses In: Knipe DMH PM; Cohen JI; Griffin DE; Lamb RA Martin MA; Racaniello VR; Roizman B., editor. *Fields virology*. 1. 2013;
7. Gupta S, Krishnan A, Sharma S, Kumar P, Aneja S, Ray P. Changing pattern of prevalence, genetic diversity, and mixed infections of viruses associated with acute gastroenteritis in pediatric patients in New Delhi, India. *J Med Virol*. 2018;90(3):469–76.
8. Jarchow-Macdonald AA, Halley S, Chandler D, Gunson R, Shepherd SJ, Parcell BJ. First report of an astrovirus type 5 gastroenteritis outbreak in a residential elderly care home identified by sequencing. *J Clin Virol* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2020 May 6];73:115–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26590691>
9. Finkbeiner SR, Li Y, Ruone S, Conrardy C, Gregoricus N, Toney D, et al. Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *J Virol* [Internet]. 2009 Oct [cited 2019 Oct 15];83(20):10836–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706703>
10. Finkbeiner SR, Le BM, Holtz LR, Storch GA, Wang D. Detection of newly described astrovirus MLB1 in stool samples from children. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(3):441–4.
11. Finkbeiner SR, Holtz LR, Jiang Y, Rajendran P, Franz CJ, Zhao G, et al. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Virol J*. 2009;6.
12. Finkbeiner SR, Kirkwood CD, Wang D. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *Virol J*. 2008;5.
13. Finkbeiner SR, Allred AF, Tarr PI, Klein EJ, Kirkwood CD, Wang D. Metagenomic

Analysis of Human Diarrhea: Viral Detection and Discovery. Holmes EC, editor. PLoS Pathog [Internet]. 2008 Feb 29 [cited 2020 May 6];4(2):e1000011. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000011>

14. Kapoor A, Li L, Victoria J, Oderinde B, Mason C, Pandey P, et al. Multiple novel astrovirus species in human stool. *J Gen Virol*. 2009;90(12):2965–72.
15. Vu DL, Cordey S, Brito F, Kaiser L. Novel human astroviruses: Novel human diseases? [Internet]. Vol. 82, *Journal of Clinical Virology*. Elsevier B.V.; 2016 [cited 2020 May 6]. p. 56–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27434149>
16. Kolawole AO, Mirabelli C, Hill DR, Svoboda SA, Janowski AB, Passalacqua KD, et al. Astrovirus replication in human intestinal enteroids reveals multi-cellular tropism and an intricate host innate immune landscape. *PLoS Pathog*. 2019;15(10).
17. Cortez V, Boyd DF, Crawford JC, Sharp B, Livingston B, Rowe HM, et al. Astrovirus infects actively secreting goblet cells and alters the gut mucus barrier. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15999-y>
18. Moser LA, Carter M, Schultz-Cherry S. Astrovirus Increases Epithelial Barrier Permeability Independently of Viral Replication. *J Virol*. 2007 Nov 1;81(21):11937–45.
19. Meliopoulos VA, Marvin SA, Freiden P, Moser LA, Nighot P, Ali R, et al. Oral administration of astrovirus capsid protein is sufficient to induce acute diarrhea in vivo. *MBio* [Internet]. 2016 [cited 2020 May 6];7(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27803180>
20. Holtz LR, Bauer IK, Rajendran P, Kang G, Wang D. Astrovirus MLB1 is not associated with diarrhea in a cohort of Indian children. *PLoS One*. 2011 Dec 9;6(12).
21. Meyer CT, Bauer IK, Antonio M, Adeyemi M, Saha D, Oundo JO, et al. Prevalence of classic, MLB-clade and VA-clade Astroviruses in Kenya and the Gambia Emerging viruses. *Virol J*. 2015 May 15;12(1).
22. Vu DL, Sabrià A, Aregall N, Michl K, Sabrià J, Rodriguez Garrido V, et al. A Spanish case-control study in <5 year-old children reveals the lack of association between MLB and VA astrovirus and diarrhea. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Sep 23];10(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58691-3>
23. Resque HR, Munford V, Castilho JG, Schmich H, Caruzo TAR, Rácz ML. Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(8):969–74.
24. Kapusinszky B, Minor P, Delwart E. Nearly constant shedding of diverse enteric viruses by two healthy infants. *J Clin Microbiol*. 2012 Nov;50(11):3427–34.

25. Moser LA, Schultz-Cherry S. Pathogenesis of astrovirus infection. Vol. 18, *Viral Immunology*. 2005. p. 4–10.
26. Quan PL, Wagner TA, Briese T, Torgerson TR, Hornig M, Tashmukhamedova A, et al. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jun;16(6):918–25.
27. Naccache SN, Peggs KS, Mattes FM, Phadke R, Garson JA, Grant P, et al. Diagnosis of neuroinvasive astrovirus infection in an immunocompromised adult with encephalitis by unbiased next-generation sequencing. *Clin Infect Dis*. 2015;60(6):919–23.
28. Frémond ML, Pérot P, Muth E, Cros G, Dumarest M, Mahlaoui N, et al. Next-generation sequencing for diagnosis and tailored therapy: A case report of astrovirus-associated progressive encephalitis. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2015;4(3):e53–7.
29. Brown JR, Morfopoulou S, Hubb J, Emmett WA, Ip W, Shah D, et al. Astrovirus VA1/HMO-C: An increasingly recognized neurotropic pathogen in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*. 2015;60(6):881–8.
30. Król L, Turkiewicz D, Nordborg K, Englund E, Stenberg L, Karlsson Lindsjö O, et al. Astrovirus VA1/HMO encephalitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation: Significant role of immune competence in virus control. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2021 Aug 19 [cited 2021 Sep 23];e29286. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.29286>
31. Sato M, Kuroda M, Kasai M, Matsui H, Fukuyama T, Katano H, et al. Acute encephalopathy in an immunocompromised boy with astrovirus-MLB1 infection detected by next generation sequencing. *J Clin Virol*. 2016 May 1;78:66–70.
32. Cordey S, Vu DL, Schibler M, L’Huillier AG, Brito F, Docquier M, et al. Astrovirus MLB2, a new gastroenteric virus associated with meningitis and disseminated infection. *Emerg Infect Dis*. 2016 May 1;22(5):846–53.
33. Koukou G, Niendorf S, Hornei B, Schlump JU, Jenke AC, Jacobsen S. Human astrovirus infection associated with encephalitis in an immunocompetent child: A case report. *J Med Case Rep*. 2019 Nov 23;13(1).
34. Wunderli W, Meerbach A, Guengoer T, Berger C, Greiner O, Caduff R, et al. Astrovirus infection in hospitalized infants with severe combined immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *PLoS One* [Internet]. 2011 Nov 11 [cited 2020 May 6];6(11):e27483. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22096580>
35. Wüthrich D, Boujon CL, Truchet L, Selimovic-Hamza S, Oevermann A, Bouzalas IG, et al. Exploring the virome of cattle with non-suppurative encephalitis of unknown etiology by metagenomics. *Virology* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2020 May

- 6];493:22–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26994586>
36. Pfaff F, Schlottau K, Scholes S, Courtenay A, Hoffmann B, Höper D, et al. A novel astrovirus associated with encephalitis and ganglionitis in domestic sheep. *Transbound Emerg Dis.* 2017 Jun 1;64(3):677–82.
 37. Blomström AL, Widén F, Hammer AS, Belák S, Berg M. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol.* 2010 Dec;48(12):4392–6.
 38. Blomström AL, Ley C, Jacobson M. Astrovirus as a possible cause of congenital tremor type All in piglets? *Acta Vet Scand.* 2014 Dec 16;56(1):82.
 39. Wylie KM, Mihindukulasuriya KA, Sodergren E, Weinstock GM, Storch GA. Sequence analysis of the human virome in Febrile and Afebrile children. *PLoS One.* 2012 Jun 13;7(6).
 40. Holtz LR, Wylie KM, Sodergren E, Jiang Y, Franz CJ, Weinstock GM, et al. Astrovirus MLB2 Viremia in febrile child. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(11):2050–2.
 41. Lum SH, Turner A, Guiver M, Bonney D, Martland T, Davies E, et al. An emerging opportunistic infection: fatal astrovirus (VA1/HMO-C) encephalitis in a pediatric stem cell transplant recipient. *Transpl Infect Dis.* 2016 Dec 1;18(6):960–4.
 42. Midthun K, Greenberg HB, Kurtz JB, Gary GW, Lin FYC, Kapikian AZ. Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *J Clin Microbiol.* 1993;31(4):955–62.
 43. Kurtz JB, Lee TW, Craig JW, Reed SE. Astrovirus infection in volunteers. *J Med Virol.* 1979;3(3):221–30.
 44. Abad FX, Pintó RM, Villena C, Gajardo R, Bosch A. Astrovirus survival in drinking water. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Aug;63(8):3119–22.
 45. Pintó RM, Villena C, Le Guyader F, Guix S, Calallero S, Pommepuy M, et al. Astrovirus detection in wastewater samples. In: *Water Science and Technology.* 2001. p. 73–6.
 46. El-Senousy WM, Guix S, Abid I, Pintó RM, Bosch A. Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Jan;73(1):164–7.
 47. Lizasoain A, Tort LFL, García M, Gómez MM, Leite JPG, Miagostovich MP, et al. Environmental assessment reveals the presence of MLB-1 human astrovirus in Uruguay. *J Appl Microbiol.* 2015 Sep 1;119(3):859–67.
 48. Nadan S, Walter JE, Grabow WOK, Mitchell DK, Taylor MB. Molecular characterization of astroviruses by reverse transcriptase PCR and sequence analysis: Comparison of clinical and environmental isolates from South Africa. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Feb 1;69(2):747–53.

49. Pinto RM, Abad FX, Gajardo R, Bosch A. Detection of infectious astroviruses in water. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1996 May [cited 2020 May 6];62(5):1811–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16535324>
50. Herrmann JE, Blacklow NR, Taylor DN, Echeverri P. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N Engl J Med* [Internet]. 1991 Jun 20 [cited 2020 May 6];324(25):1757–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1645459>
51. Méndez-Toss M, Griffin DD, Calva J, Contreras JF, Puerto FI, Mota F, et al. Prevalence and Genetic Diversity of Human Astroviruses in Mexican Children with Symptomatic and Asymptomatic Infections. *J Clin Microbiol*. 2004 Jan;42(1):151–7.
52. Todd ECD, Greig JD, Bartleson CA, Michaels BS. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 3. Factors contributing to outbreaks and description of outbreak categories. Vol. 70, *Journal of Food Protection*. IAMFES; 2007. p. 2199–217.
53. Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, Lewis D, et al. 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*. 2005 Aug;43(8):3890–4.
54. Cubitt WD, Mitchell DK, Carter MJ, Willcocks MM, Holzel H. Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. *J Med Virol*. 1999 Mar 1;57(3):313–21.
55. Abad FX, Villena C, Guix S, Caballero S, Pintó RM, Bosch A. Potential Role of Fomites in the Vehicular Transmission of Human Astroviruses. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Sep;67(9):3904–7.
56. Reither K, Ignatius R, Weitzel T, Seidu-Korkor A, Anyidoho L, Saad E, et al. Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics. *BMC Infect Dis*. 2007;7:104.
57. Ouédraogo N, Kaplon J, Bonkougou IJO, Traoré AS, Pothier P, Barro N, et al. Prevalence and genetic diversity of enteric viruses in children with diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. *PLoS One*. 2016;11(4):1–22.
58. Grant L, Vinjé J, Parashar U, Watt J, Reid R, Weatherholtz R, et al. Epidemiologic and clinical features of other enteric viruses associated with acute gastroenteritis in American Indian infants. *J Pediatr*. 2012;161(1).
59. Khamrin P, Thongprachum A, Okitsu S, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Multiple astrovirus MLB1, MLB2, VA2 clades, and classic human astrovirus in children with acute gastroenteritis in Japan. *J Med Virol*. 2016 Feb 1;88(2):356–60.
60. Burbelo PD, Ching KH, Esper F, Iadarola MJ, Delwart E, Lipkin WI, et al. Serological

studies confirm the novel astrovirus HMOAstV-C as a highly prevalent human infectious agent. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cited 2020 May 6];6(8):e22576. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21829634>

61. Holtz LR, Bauer IK, Jiang H, Belshe R, Freiden P, Schultz-Cherry SL, et al. Seroepidemiology of astrovirus MLB1. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(6):908–11.
62. Brown JR, Morfopoulou S, Hubb J, Emmett WA, Ip W, Shah D, et al. Astrovirus VA1/HMO-C: an increasingly recognized neurotropic pathogen in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2015 Mar 15 [cited 2020 May 6];60(6):881–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25572899>
63. De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2019 Oct 16];11(7):1529–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21843659>
64. Pérot P, Lecuit M, Eloit M. Astrovirus diagnostics. Vol. 9, *Viruses*. MDPI AG; 2017.
65. Cortez V, Meliopoulos VA, Karlsson EA, Hargest V, Johnson C, Schultz-Cherry S. Astrovirus Biology and Pathogenesis. *Annu Rev Virol* [Internet]. 2017 [cited 2019 Oct 27];4(1):327–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28715976>
66. Marczinke B, Bloys AJ, Brown TD, Willcocks MM, Carter MJ, Brierley I. The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting. *J Virol* [Internet]. 1994 Sep [cited 2019 Oct 31];68(9):5588–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8057439>
67. Monroe SS, Jiang B, Stine SE, Koopmans M, Glass RI. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *J Virol* [Internet]. 1993 Jun [cited 2019 Oct 9];67(6):3611–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8497068>
68. Lulla V, Firth AE. A hidden gene in astroviruses encodes a cell-permeabilizing protein involved in virus release. *bioRxiv* [Internet]. 2019 [cited 2019 Oct 9];661579. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/661579v1>
69. Brinker JP, Blacklow NR, Herrmann JE. Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines. *Arch Virol*. 2000;145(9):1847–56.
70. Donelli G, Superti F, Tinari A, Marziano ML. Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells. *J Med Virol*. 1992;38(4):271–7.
71. Mendez E, Munoz-Yanez C, Sanchez-San Martin C, Aguirre-Crespo G, Banos-Lara M d. R, Gutierrez M, et al. Characterization of Human Astrovirus Cell Entry. *J Virol*. 2014 Mar 1;88(5):2452–60.

72. Aguilar-Hernández N, Meyer L, López S, DuBois RM, Arias CF. Protein Disulfide Isomerase A4 Is Involved in Genome Uncoating during Human Astrovirus Cell Entry. *Viruses* [Internet]. 2020 Dec 31 [cited 2021 Sep 24];13(1):53. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/1/53>
73. Guix S, Caballero S, Bosch A, Pintó RM. C-Terminal nsP1a Protein of Human Astrovirus Colocalizes with the Endoplasmic Reticulum and Viral RNA. *J Virol*. 2004 Dec 15;78(24):13627–36.
74. Fuentes C, Bosch A, Pintó RM, Guix S. Identification of Human Astrovirus Genome-Linked Protein (VPg) Essential for Virus Infectivity. *J Virol*. 2012 Sep 15;86(18):10070–8.
75. Schultz-Cherry S. Astrovirus research: Essential ideas, everyday impacts, future directions. *Astrovirus Res Essent Ideas, Everyday Impacts, Futur Dir*. 2013;1–185.
76. Arias CF, Dubois RM. The astrovirus capsid: A review. Vol. 9, *Viruses*. MDPI AG; 2017.
77. Sztuba-Solińska J, Stollar V, Bujarski JJ. Subgenomic messenger RNAs: Mastering regulation of (+)-strand RNA virus life cycle. Vol. 412, *Virology*. Virology; 2011. p. 245–55.
78. Méndez E, Salas-Ocampo E, Arias CF. Caspases Mediate Processing of the Capsid Precursor and Cell Release of Human Astroviruses. *J Virol*. 2004 Aug 15;78(16):8601–8.
79. Toh Y, Harper J, Dryden KA, Yeager M, Arias CF, Méndez E, et al. Crystal Structure of the Human Astrovirus Capsid Protein. *J Virol*. 2016 Oct 15;90(20):9008–17.
80. Banos-Lara M del R, Méndez E. 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*. 2010 Jun;401(2):322–32.
81. Méndez E, Fernández-Luna T, López S, Méndez-Toss M, Arias CF. Proteolytic Processing of a Serotype 8 Human Astrovirus ORF2 Polyprotein. *J Virol*. 2002 Aug 15;76(16):7996–8002.
82. Gray EW, Angus KW, Snodgrass DR. Ultrastructure of the small intestine in astrovirus-infected lambs. *J Gen Virol*. 1980;49(1):71–82.
83. Caballero S, Guix S, Ribes E, Bosch A, Pintó RM. Structural Requirements of Astrovirus Virus-Like Particles Assembled in Insect Cells. *J Virol*. 2004 Dec 1;78(23):13285–92.
84. Dalton RM, Pastrana EP, Sánchez-Fauquier A. Vaccinia Virus Recombinant Expressing an 87-Kilodalton Polyprotein That Is Sufficient To Form Astrovirus-Like Particles. *J Virol*. 2003 Aug 15;77(16):9094–8.
85. Jackson WT, Giddings TH, Taylor MP, Mulinyawe S, Rabinovitch M, Kopito RR, et al.

- Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 2005;3(5):0861–71.
86. Dryden KA, Tihova M, Nowotny N, Matsui SM, Mendez E, Yeager M. Immature and mature human astrovirus: Structure, conformational changes, and similarities to hepatitis e virus. *J Mol Biol.* 2012 Oct 5;422(5):650–8.
 87. Espinosa-Hernández W, Velez-Uriza D, Valdés J, Vélez-Del Valle C, Salas-Benito J, Martínez-Contreras R, et al. PTB binds to the 3' untranslated region of the human astrovirus type 8: A possible role in viral replication. *PLoS One.* 2014 Nov 18;9(11).
 88. Tange S, Zhou Y, Nagakui-Noguchi Y, Imai T, Nakanishi A. Initiation of human astrovirus type 1 infection was blocked by inhibitors of phosphoinositide 3-kinase. *Virology.* 2013;10.
 89. Murillo A, Vera-Estrella R, Barkla BJ, Méndez E, Arias CF. Identification of Host Cell Factors Associated with Astrovirus Replication in Caco-2 Cells. *J Virol.* 2015 Oct 15;89(20):10359–70.
 90. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. Vol. 426, *Nature.* 2003. p. 895–9.
 91. Schwartz AL, Ciechanover A. Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2009 [cited 2019 Oct 15];49:73–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18834306>
 92. Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2008 Dec [cited 2019 Oct 15];1786(2):153–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18558098>
 93. Goldberg AL. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2007 Feb [cited 2019 Oct 15];35(Pt 1):12–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17212580>
 94. Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications [Internet]. Vol. 26, *Cell Research.* Nature Publishing Group; 2016 [cited 2021 Sep 24]. p. 399–422. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27012465/>
 95. Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2005 Aug [cited 2019 Oct 15];6(8):599–609. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16064136>
 96. Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. Vol. 2, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2001. p. 169–78.
 97. Ciechanover A, Iwai K. The ubiquitin system: From basic mechanisms to the patient

- bed. Vol. 56, IUBMB Life. 2004. p. 193–201.
98. Ciechanover A, Ben-Saadon R. N-terminal ubiquitination: More protein substrates join in. Vol. 14, Trends in Cell Biology. Elsevier Ltd; 2004. p. 103–6.
 99. Hicke L. Protein regulation by monoubiquitin. Vol. 2, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2001. p. 195–201.
 100. Gao G, Luo H. The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections. In: Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2006. p. 5–14.
 101. Atkin G, Paulson H. Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease. Vol. 7, Frontiers in Molecular Neuroscience. Frontiers Research Foundation; 2014.
 102. Zheng Q, Huang T, Zhang L, Zhou Y, Luo H, Xu H, et al. Dysregulation of Ubiquitin-Proteasome System in Neurodegenerative Diseases. Front Aging Neurosci [Internet]. 2016 [cited 2019 Oct 27];8:303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28018215>
 103. Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and Cellular Roles of Ubiquitin-Specific Deubiquitinating Enzymes. Annu Rev Biochem. 2009 Jun;78(1):363–97.
 104. Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. Vol. 1695, Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research. 2004. p. 189–207.
 105. Clague MJ, Urbé S, Komander D. Breaking the chains: deubiquitylating enzyme specificity begets function [Internet]. Vol. 20, Nature Reviews Molecular Cell Biology. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2021 Aug 3]. p. 338–52. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41580-019-0099-1>
 106. Todi S V., Paulson HL. Balancing act: Deubiquitinating enzymes in the nervous system. Vol. 34, Trends in Neurosciences. 2011. p. 370–82.
 107. Kunjappu MJ, Hochstrasser M. Assembly of the 20S proteasome. Vol. 1843, Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research. Biochim Biophys Acta; 2014. p. 2–12.
 108. Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D. The Regulatory Particle of the *Saccharomyces cerevisiae* Proteasome. Mol Cell Biol. 1998 Jun 1;18(6):3149–62.
 109. Śledź P, Förster F, Baumeister W. Allosteric effects in the regulation of 26S proteasome activities [Internet]. Vol. 425, Journal of Molecular Biology. Academic Press; 2013 [cited 2021 Aug 5]. p. 1415–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23416139/>
 110. Yu H, Matouschek A. Recognition of Client Proteins by the Proteasome [Internet]. Vol. 46, Annual Review of Biophysics. Annual Reviews Inc.; 2017 [cited 2021 Aug 5]. p. 149–73. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biophys-070816-033719>

111. Bai M, Zhao X, Sahara K, Ohte Y, Hirano Y, Kaneko T, et al. Assembly mechanisms of specialized core particles of the proteasome. *Biomolecules*. 2014 Sep 1;4(3):662–77.
112. Kammerl IE, Meiners S. Proteasome function shapes innate and adaptive immune responses. Vol. 311, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. American Physiological Society; 2016. p. L328–36.
113. Sasaki K, Takada K, Ohte Y, Kondo H, Sorimachi H, Tanaka K, et al. Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8+ T cells. *Nat Commun*. 2015 Jun 23;6.
114. Qian MX, Pang Y, Liu CH, Haratake K, Du BY, Ji DY, et al. XAcetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell*. 2013 May 23;153(5):1012.
115. Zhong L, Belote JM. The testis-specific proteasome subunit Pro α 6T of D. melanogaster is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis. *Development*. 2007 Oct;134(19):3517–25.
116. Fort P, Kajava A V., Delsuc F, Coux O. Evolution of proteasome regulators in Eukaryotes. *Genome Biol Evol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2021 Sep 28];7(5):1363–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25943340/>
117. Chen X, Lee BH, Finley D, Walters KJ. Structure of Proteasome Ubiquitin Receptor hRpn13 and Its Activation by the Scaffolding Protein hRpn2. *Mol Cell* [Internet]. 2010 May 14 [cited 2021 Aug 5];38(3):404–15. Available from: </pmc/articles/PMC2887722/>
118. Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* [Internet]. 2012 Feb 9 [cited 2021 Aug 5];482(7384):186–91. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature10774>
119. Shi Y, Chen X, Elsasser S, Stocks BB, Tian G, Lee BH, et al. Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome. *Science* (80-). 2016 Feb 19;351(6275).
120. Bard JAM, Goodall EA, Greene ER, Jonsson E, Dong KC, Martin A. Structure and Function of the 26S Proteasome [Internet]. Vol. 87, *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews Inc.; 2018 [cited 2021 Sep 28]. p. 697–724. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-biochem-062917-011931>
121. van Nocker S, Sadis S, Rubin DM, Glickman M, Fu H, Coux O, et al. The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1996 Nov [cited 2021 Sep

- 28];16(11):6020–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8887631/>
122. Hendil KB, Khan S, Tanaka K. Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem J* [Internet]. 1998 Jun 15 [cited 2021 Sep 28];332(3):749–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9620878/>
 123. Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K. Hybrid proteasomes. Induction by interferon- γ and contribution to ATP- dependent proteolysis. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 May 12 [cited 2021 Sep 28];275(19):14336–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10799514/>
 124. Rechsteiner M, Hill CP. Mobilizing the proteolytic machine: Cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. Vol. 15, *Trends in Cell Biology*. Trends Cell Biol; 2005. p. 27–33.
 125. Mao I, Liu J, Li X, Luo H. REG γ , a proteasome activator and beyond? Vol. 65, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Cell Mol Life Sci; 2008. p. 3971–80.
 126. Groettrup M, Kirk CJ, Basler M. Proteasomes in immune cells: More than peptide producers? Vol. 10, *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol; 2010. p. 73–8.
 127. Stadtmueller BM, Hill CP. Proteasome activators. Vol. 41, *Molecular Cell*. NIH Public Access; 2011. p. 8–19.
 128. Thibaudeau TA, Smith DM. A practical review of proteasome pharmacology. *Pharmacol Rev*. 2019 Apr 1;71(2):170–97.
 129. Goldberg AL. Functions of the proteasome: From protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. In: *Biochemical Society Transactions*. 2007. p. 12–7.
 130. Adams GM, Crotchett B, Slaughter CA, DeMartino GN, Gogol EP. Formation of proteasome-PA700 complexes directly correlates with activation of peptidase activity. *Biochemistry* [Internet]. 1998 Sep 15 [cited 2021 Jan 21];37(37):12927–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9737872/>
 131. An B, Goldfarb RH, Siman R, Ping Dou Q. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. *Cell Death Differ* [Internet]. 1998 Dec 1 [cited 2021 Jan 21];5(12):1062–75. Available from: <http://www.stockton-press.co.uk/cdd>
 132. Masdehors P, Omura S, Merle-Beral H, Mentz F, Cosset JM, Dumont J, et al. Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin. *Br J Haematol* [Internet]. 1999 [cited 2021 Jan 21];105(3):752–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10354141/>
 133. Adams J. Proteasome inhibition in cancer: Development of PS-341. *Semin Oncol*

- [Internet]. 2001 [cited 2021 Jan 21];28(6):613–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11740819/>
134. Goldberg AL. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *J Cell Biol* [Internet]. 2012 Nov [cited 2021 Jan 21];199(4):583–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23148232/>
 135. Alfred L. Goldberg: Probing the Proteasome [Internet]. Vol. 26, *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2016 [cited 2021 Jan 21]. p. 792–4. Available from: <http://www.cell.com/article/S0962892416301337/fulltext>
 136. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: From research tools to drug candidates [Internet]. Vol. 8, *Chemistry and Biology*. *Chem Biol*; 2001 [cited 2021 Jan 21]. p. 739–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11514224/>
 137. Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Mar 31 [cited 2021 Jan 21];281(13):8582–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16455650/>
 138. Shaw E. CysteinyI proteinases and their selective inactivation. [Internet]. Vol. 63, *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*; 1990 [cited 2021 Jan 21]. p. 271–347. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2407065/>
 139. Meng L, Mohan R, Kwok BHB, Elofsson M, Sin N, Crews CM. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 Aug 31 [cited 2021 Jan 21];96(18):10403–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10468620/>
 140. Groll M, Bajorek M, Köhler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, et al. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol*. 2000;7(11):1062–7.
 141. Groll M, Huber R. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: A structural approach [Internet]. Vol. 1695, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. *Biochim Biophys Acta*; 2004 [cited 2021 Jan 21]. p. 33–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15571807/>
 142. Thibaudeau TA, Smith DM. A practical review of proteasome pharmacology. *Pharmacol Rev*. 2019;71(2):170–97.
 143. Screen M, Britton M, Downey SL, Verdoes M, Voges MJ, Blom AEM, et al. Nature of pharmacophore influences active site specificity of proteasome inhibitors. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Dec 17 [cited 2021 Jan 21];285(51):40125–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20937826/>
 144. Kraus M, Bader J, Geurink PP, Weyburne ES, Mirabella AC, Silzle T, et al. The novel β 2-selective proteasome inhibitor LU-102 synergizes with bortezomib and carfilzomib to overcome proteasome inhibitor resistance of myeloma cells.

- Haematologica [Internet]. 2015 Oct 2 [cited 2021 Jan 21];100(10):1350–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26069288/>
145. Alcaide-Loridan C, Jupin I. Ubiquitin and plant viruses, let's play together! *Plant Physiol.* 2012 Sep;160(1):72–82.
 146. Luo H. Interplay between the virus and the ubiquitin-proteasome system: molecular mechanism of viral pathogenesis. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2016 [cited 2019 Oct 28];17:1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26426962>
 147. Calistri A, Munegato D, Carli I, Parolin C, Palù G. The Ubiquitin-Conjugating System: Multiple Roles in Viral Replication and Infection. *Cells.* 2014 May 6;3(2):386–417.
 148. Marques JT, Rebouillat D, Ramana C V., Murakami J, Hill JE, Gudkov A, et al. Down-Regulation of p53 by Double-Stranded RNA Modulates the Antiviral Response. *J Virol.* 2005 Sep 1;79(17):11105–14.
 149. Querido E, Blanchette P, Yan Q, Kamura T, Morrison M, Boivin D, et al. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev.* 2001 Dec 1;15(23):3104–17.
 150. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 1993 Nov 5;75(3):495–505.
 151. Saridakis V, Sheng Y, Sarkari F, Holowaty MN, Shire K, Nguyen T, et al. Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to epstein-barr nuclear antigen 1: Implications for EBV-mediated immortalization. *Mol Cell.* 2005 Apr 1;18(1):25–36.
 152. Ye R, Su C, Xu H, Zheng C. Herpes Simplex Virus 1 Ubiquitin-Specific Protease UL36 Abrogates NF- κ B Activation in DNA Sensing Signal Pathway. *J Virol.* 2017 Mar 1;91(5).
 153. Wiertz EJHJ, Tortorella D, Bogyo M, Yu J, Mothes W, Jones TR, et al. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature.* 1996 Dec 5;384(6608):432–8.
 154. Wiertz EJHJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell.* 1996 Mar 8;84(5):769–79.
 155. Rajsbaum R, Albrecht RA, Wang MK, Maharaj NP, Versteeg GA, Nistal-Villán E, et al. Species-Specific Inhibition of RIG-I Ubiquitination and IFN Induction by the Influenza A Virus NS1 Protein. *PLoS Pathog* [Internet]. 2012 Nov [cited 2021 Aug 7];8(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23209422/>
 156. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* [Internet]. 2007 Apr 19 [cited 2021 Aug 7];446(7138):916–20. Available from:

<https://www.nature.com/articles/nature05732>

157. Oshiumi H, Matsumoto M, Hatakeyama S, Seya T. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Jan 9 [cited 2021 Aug 7];284(2):807–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19017631/>
158. Liu Y, Olganier D, Lin R. Host and viral modulation of RIG-I-mediated antiviral immunity. Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
159. Inn K-S, Lee S-H, Rathbun JY, Wong L-Y, Toth Z, Machida K, et al. Inhibition of RIG-I-Mediated Signaling by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Deubiquitinase ORF64. *J Virol*. 2011 Oct 15;85(20):10899–904.
160. Arnold MM. The Rotavirus Interferon Antagonist NSP1: Many Targets, Many Questions. *J Virol*. 2016 Jun;90(11):5212–5.
161. Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi P-Y, García-Sastre A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol* [Internet]. 2009 Jun [cited 2019 Nov 27];83(11):5408–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279106>
162. Chiu MH, Chen IH, Baulcombe DC, Tsai CH. The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol Plant Pathol*. 2010 Sep;11(5):641–9.
163. Kikkert M, Hassink GM, Barel Christian H, Van der Wal FJ, Wiertz E. Ubiquitination is essential for human cytomegalovirus US11-mediated dislocation of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochem J*. 2001 Sep 1;358(2):369–77.
164. Dubiella U, Serrano I. The ubiquitin proteasome system as a double agent in plant-virus interactions [Internet]. Vol. 10, *Plants*. MDPI AG; 2021 [cited 2021 Jul 27]. Available from: </pmc/articles/PMC8148538/>
165. Kerkvliet J, Papke L, Rodriguez M. Antiviral Effects of a Transgenic RNA-Dependent RNA Polymerase. *J Virol*. 2011 Jan 1;85(1):621–5.
166. Kamio M, Yoshida T, Ogata H, Douchi T, Nagata Y, Inoue M, et al. SOC1 inhibits HPV-E7-mediated transformation by inducing degradation of E7 protein. *Oncogene*. 2004 Apr 15;23(17):3107–15.
167. Oh K-J, Kalinina A, Wang J, Nakayama K, Nakayama KI, Bagchi S. The Papillomavirus E7 Oncoprotein Is Ubiquitinated by Ubch7 and Cullin 1- and Skp2-Containing E3 Ligase. *J Virol*. 2004 May 15;78(10):5338–46.
168. Ko A, Lee E-W, Yeh J-Y, Yang M-R, Oh W, Moon J-S, et al. MKRN1 induces degradation of West Nile virus capsid protein by functioning as an E3 ligase. *J Virol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2019 Nov 27];84(1):426–36. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846531>

169. Wang T, Du Q, Wu X, Niu Y, Guan L, Wang Z, et al. Porcine MKRN1 Modulates the Replication and Pathogenesis of Porcine Circovirus Type 2 by Inducing Capsid Protein Ubiquitination and Degradation. *J Virol*. 2018 Jun;92(11).
170. Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, et al. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: a ubiquitin-dependent mechanism and a ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent mechanism. *J Virol* [Internet]. 2009 Mar [cited 2019 Nov 27];83(5):2389–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19091860>
171. Reichel C, Beachy RN. Degradation of Tobacco Mosaic Virus Movement Protein by the 26S Proteasome. *J Virol* [Internet]. 2000 Apr [cited 2021 Jul 28];74(7):3330–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10708450/>
172. Barajas D, Li Z, Nagy PD. The Nedd4-type Rsp5p ubiquitin ligase inhibits tombusvirus replication by regulating degradation of the p92 replication protein and decreasing the activity of the tombusvirus replicase. *J Virol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2019 Nov 27];83(22):11751–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759160>
173. Reuter G, Pankovics P, Boros Á. Nonsuppurative (Aseptic) Meningoencephalomyelitis Associated with Neurovirulent Astrovirus Infections in Humans and Animals. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2018 [cited 2019 Oct 27];31(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30158300>
174. Cordey S, Brito F, Vu DL, Turin L, Kilowoko M, Kyungu E, et al. Astrovirus VA1 identified by next-generation sequencing in a nasopharyngeal specimen of a febrile Tanzanian child with acute respiratory disease of unknown etiology. Vol. 5, *Emerging Microbes and Infections*. Nature Publishing Group; 2016.
175. Janowski AB, Bauer IK, Holtz LR, Wang D. Propagation of Astrovirus VA1, a Neurotropic Human Astrovirus, in Cell Culture. *J Virol* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2019 Oct 15];91(19). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28701405>
176. Hargest V, Davis AE, Tan S, Cortez V, Schultz-Cherry S. Human astroviruses: A tale of two strains. *Viruses* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2021 Jul 28];13(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33673521/>
177. Aguilera C. Caracterización del crecimiento y del procesamiento de la proteína de la cápside del astrovirus neurotrópico VA1. Universidad Nacional Autónoma de México; 2020.
178. Casorla-Pérez LA, López T, López S, Arias CF. The Ubiquitin-Proteasome System Is Necessary for Efficient Replication of Human Astrovirus. *J Virol* [Internet]. 2018

[cited 2019 Oct 15];92(2). Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29093085>

179. Quintero-Ochoa G, Romero-Argüelles R, Aviles-Hernández A, Cejudo-Flores M, Calleja-García P, Domínguez-Gámez M, et al. Viral agents of gastroenteritis and their correlation with clinical symptoms in rotavirus-vaccinated children. *Infect Genet Evol.* 2019 Sep 1;73:190–6.
180. Elliott EJ. Acute gastroenteritis in children. Vol. 334, *British Medical Journal*. BMJ Publishing Group; 2007. p. 35–40.
181. Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, Schnurr DP, Forghani B, Cossen CK, et al. Beyond Viruses: Clinical Profiles and Etiologies Associated with Encephalitis [Internet]. 2006. Available from:
<https://academic.oup.com/cid/article/43/12/1565/278153>
182. Gao L, Tu H, Shi ST, Lee K-J, Asanaka M, Hwang SB, et al. Interaction with a Ubiquitin-Like Protein Enhances the Ubiquitination and Degradation of Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. *J Virol.* 2003 Apr 1;77(7):4149–59.
183. Paradkar PN, Duchemin JB, Rodriguez-Andres J, Trinidad L, Walker PJ. Cullin4 Is Pro-Viral during West Nile Virus Infection of Culex Mosquitoes. *PLoS Pathog.* 2015;11(9):1–21.
184. Raaben M, Posthuma CC, Verheije MH, te Lintelo EG, Kikkert M, Drijfhout JW, et al. The Ubiquitin-Proteasome System Plays an Important Role during Various Stages of the Coronavirus Infection Cycle. *J Virol.* 2010 Aug 1;84(15):7869–79.
185. Karpe YA, Meng X-J. Hepatitis E Virus Replication Requires an Active Ubiquitin-Proteasome System. *J Virol.* 2012 May 15;86(10):5948–52.
186. Kaur P, Lello LS, Utt A, Dutta SK, Merits A, Chu JJH. Bortezomib inhibits chikungunya virus replication by interfering with viral protein synthesis. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020;14(5):1–25. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008336>
187. Llamas-González YY, Campos D, Pascale JM, Arbiza J, González-Santamaría J. A functional ubiquitin-proteasome system is required for efficient replication of new world mayaro and una alphaviruses. *Viruses* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Aug 10];11(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31018496/>
188. Downey SL, Florea BI, Overkleeft HS, Kisselev AF. Use of proteasome inhibitors. *Curr Protoc Immunol* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 14];2015:9.10.1-9.10.9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25845565/>
189. Yu G-Y, Lai MMC. The Ubiquitin-Proteasome System Facilitates the Transfer of Murine Coronavirus from Endosome to Cytoplasm during Virus Entry. *J Virol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2021 Aug 15];79(1):644–8. Available from:
<https://journals.asm.org/journal/jvi>

190. Wang S, Liu H, Zu X, Liu Y, Chen L, Zhu X, et al. The ubiquitin-proteasome system is essential for the productive entry of Japanese encephalitis virus. *Virology* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2021 Jun 22];498:116–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.08.013>
191. Khor R, McElroy LJ, Whittaker GR. The ubiquitin-vacuolar protein sorting system is selectively required during entry of influenza virus into host cells. *Traffic* [Internet]. 2003 Dec [cited 2021 Aug 15];4(12):857–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14617349/>
192. Byk LA, Iglesias NG, De Maio FA, Gebhard LG, Rossi M, Gamarnik A V, et al. Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination. 2016;
193. Schneider SM, Lee BH, Nicola A V. Viral entry and the ubiquitin-proteasome system [Internet]. Vol. 23, *Cellular Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd; 2021 [cited 2021 Sep 27]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33037857/>
194. Camborde L, Jupin I, Planchais S, Tournier V, Jakubiec A, Drugeon G, et al. The ubiquitin-proteasome system regulates the accumulation of Turnip yellow mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase during viral infection. *Plant Cell* [Internet]. 2010 [cited 2021 Sep 27];22(9):3142–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20823192/>
195. Losick VP, Schlax PE, Emmons RA, Lawson TG. Signals in hepatitis A virus P3 region proteins recognized by the ubiquitin-mediated proteolytic system. *Virology* [Internet]. 2003 May 10 [cited 2021 Sep 27];309(2):306–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12758177/>
196. Barco A, Feduchi E, Carrasco L. Poliovirus protease 3C(pro) kills cells by apoptosis. *Virology* [Internet]. 2000 Jan 20 [cited 2021 Sep 27];266(2):352–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10639321/>
197. Chau DHW, Yuan J, Zhang H, Cheung P, Lim T, Liu Z, et al. Cocksackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis* [Internet]. 2007 Mar [cited 2021 Sep 27];12(3):513–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17195095/>
198. Powers JC, Asgian JL, Ekici ÖD, James KE. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* [Internet]. 2002 Dec [cited 2021 Sep 27];102(12):4639–750. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr010182v>
199. Pajonk F, Himmelsbach J, Riess K, Sommer A, McBride WH. The human immunodeficiency virus (HIV)-1 protease inhibitor saquinavir inhibits proteasome function and causes apoptosis and radiosensitization in non-HIV-associated human cancer cells. *Cancer Res*. 2002;62(18):5230–5.