



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN DEL PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA DE LA
CÁPSIDE DEL ASTROVIRUS VA1**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
CATALINA IGNACIA AGUILERA FLORES

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ
[IBt/UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dr. RAMÓN GONZÁLEZ GARCÍA CONDE
[CIDCI/UAEM](#)
Dra. ANA LORENA GUTIÉRREZ ESCOLANO
[CINVESTAV/IPN](#)

Cuernavaca, Morelos, Enero, 2023



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 departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Carlos Federico Arias Ortiz y contó con el apoyo de los donativos Fordecyt 302965 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el grant R01AI144090 del National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIH). La alumna Catalina Ignacia Aguilera Flores contó con una beca otorgada por CONACyT #779557.

Comité tutorial:

Dr. Carlos Federico Arias Ortiz

Dr. Ramón González García Conde

Dr. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Jurado de examen de grado:

Presidente Dr. Takuya Nishigaki Shimizu

Secretario Dr. Sabino Pacheco Guillen

Vocal Dr. Alejandro Alagón Cano

Vocal Dra. Rosa María del Ángel Núñez Cáceres

Vocal Dra. Vanessa López Guerrero

El autor de la tesis agradece la asesoría y el excelente apoyo técnico proporcionado por el M en C. Marco Antonio Espinoza Torres y la Q.F.B. Rafaela María del Pilar Espinosa Organista.

DEDICATORIA

*Para Ana Elizabeth Briell Muñoz
y Clara Cecilia Vega Contador*

AGRADECIMIENTOS

Primero a mis papás, Marcela y Marcelo, por los buenos conejos, el apoyo y el amor. Su confianza en mi han sido el motor de este sueño.

A mis hermanos, Francisco, Belén y Marcelo, por todo el amor que me brindan a pesar de la distancia.

A mi familia, porque por más lejos que estuviera, siempre me sentí en casa.

A mi Valquiria, por llenar mi corazón de tanto amor.

A mis amigos de la facultad, por enseñarme que el concepto de amistad es eterno.

A Kevin, por darme la certeza de que puedo con todo.

A mi tutor, el Dr. Carlos Arias, por guiarme durante mi licenciatura y maestría. Por su confianza, paciencia, instrucción y visión que me han formado como científica.

A mis compañeros del laboratorio, a Inci, por convertirse en mi hermana del alma, sin tu apoyo todo sería más difícil. A Jey y Emmanuel, por las buenas pláticas y las risas. A Carlos, por la amistad, los consejos, las ideas y experimentos que permitieron avanzar en este proyecto. Al Dr. Tomás por enseñarme a trabajar con astrovirus y siempre resolver mis dudas. Finalmente, a todo el GAL, por acogerme y acompañarme en esta travesía.

ÍNDICE

I. RESUMEN	9
II. INTRODUCCIÓN	12
I. Astrovirus	12
II. Astrovirus de humanos	14
III. Astrovirus neurotrópicos	15
IV. Genoma de los astrovirus	16
V. Estructura de los astrovirus	17
VI. Ciclo de replicación	19
I. Entrada y unión	19
II. Traducción y replicación del genoma.....	21
III. Ensamble y salida	25
III. ANTECEDENTES	27
IV. HIPÓTESIS	29
V. OBJETIVO GENERAL	29
I. OBJETIVOS PARTICULARES	29
VI. METODOLOGÍA	30
I. Células y virus	30
II. Anticuerpos	30
III. Ensayo de infectividad	31
IV. Western blot	32
V. Purificación de astrovirus VA1	32
VI. Caracterización del procesamiento de la proteína precursora de la cápside ...	33
VII. Inhibidores de proteasas	33
VIII. Construcción de la clona pT7CF1-ORF2	35

IX. Transfección de los plásmidos pT7-ORF2 VA1 en HEK 293T T7.....	37
X. Optimización del ORF1a para su clonación en el vector pT7CF1-CHis.....	38
VII. RESULTADOS	39
I. Caracterización del procesamiento de la proteína precursora de la cápside del astrovirus VA1.	39
II. Caracterización de las proteínas que forman el virión maduro	43
III. El inhibidor de proteasas ABESF disminuye el procesamiento de la proteína de la cápside y abate la infectividad del astrovirus VA1	45
IV. ¿La proteasa involucrada en el procesamiento de la proteína precursora de la cápside del ORF2 del astrovirus VA1 es de origen celular o viral?.....	47
1. Expresión del ORF2 de VA1 en células HEK 293T T7.....	47
2. Co-expresión en células HEK293T T7 del ORF2 de VA1 con la región del ORF1a, que codifica a la proteasa viral.....	49
VIII. DISCUSIÓN	52
X. PERSPECTIVAS	59
XI. REFERENCIAS	60
XII. ANEXO.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relaciones filogenéticas dentro de la familia Astroviridae.	13
Figura 2. Relaciones filogenéticas de astrovirus reconocidos por la ICTV y genomas de “posibles” astrovirus.	13
Figura 3. Organización del genoma de los astrovirus clásicos. El genoma consta de tres marcos abiertos de lectura (ORFs) que se sobrelapan.	17
Figura 4. Crio-microscopía electrónica de la partícula viral y estructura cristalográfica de las proteínas de cápside de HAstV clásicos.	19
Figura 5. Ciclo de replicación de los astrovirus clásicos.	21
Figura 6. Procesamiento putativo de las proteínas no estructurales codificadas en el ORF1a y ORF1b.	23
Figura 7. Esquema del procesamiento proteolítico de la poliproteína VP90 en los astrovirus clásicos.	26
Figura 8. Representación de la clona pT7-ORF2 VA1.	35
Figura 9. Caracterización de los productos del procesamiento de la proteína de la cápside.	40
Figura 10. Procesamiento proteolítico propuesto para la proteína de la cápside ORF2 del astrovirus VA1.	43
Figura 11. Secuenciación del N-terminal y análisis por espectrometría de masas de las proteínas de la cápside del virus maduro.	44
Figura 12. Efecto de varios inhibidores de proteasas en el procesamiento de las proteínas de la cápside y en el título infeccioso.	46
Figura 13. Metodología experimental para la transfección de la clona pT7-ORF2 VA1.	48
Figura 14. Western blot de células Caco-2 o HEK 293 T7 infectadas con VA1 y HEK 293 T7 transfectadas con pT7-ORF2 o con el vector vacío pT7CF1-CHis.	49
Figura 15. Metodología experimental para la co-transfección de la clona pT7-ORF2 VA1 y clona pT7-ORF1a optimizado en HEK 293T T7.	50
Figura 16. Western blot de la co-transfección del ORF1a optimizado junto con el ORF2 del astrovirus VA1 en la línea celular HEK 293T T7.	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Casos reportados de encefalitis por el astrovirus VA1.....	15
Tabla 2. Inhibidores de proteasas y sus características	34
Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos sintetizados para la amplificación del ORF2 a partir de la clona parcial del genoma de VA1.....	35
Tabla 4. Programa de PCR utilizado para la amplificación del inserto.....	36

I. RESUMEN

Los astrovirus de humanos (HAstV) son agentes infecciosos que típicamente infectan el tracto gastrointestinal produciendo diarreas en niños y adultos mayores. Sin embargo, en 2009 se describió un nuevo astrovirus en humanos, llamado VA1, cuya secuencia genómica es más cercana a la de cepas de astrovirus aisladas de animales que a los astrovirus que clásicamente infectan a humanos. Se ha encontrado al astrovirus VA1 en ocho pacientes inmunocomprometidos con encefalitis, por lo que se ha descrito como una cepa neurotrópica. Recientemente se describió la adaptación de esta cepa de astrovirus a crecer en cultivo celular, especialmente en células Caco-2, una línea celular derivada del epitelio intestinal humano que permite la replicación de VA1, así como de los astrovirus clásicos.

Para activar la infectividad de los HAstV clásicos es necesario que los viriones extracelulares sean tratados con la proteasa tripsina, lo que provoca que la proteína precursora de la cápside se procese proteolíticamente en dos productos finales que constituyen la partícula madura infecciosa: una proteína de 34 kDa (VP34) que corresponde al dominio del *core*, y otra de 37 kDa (VP37) que forma el dominio de la espícula viral. En contraste, el astrovirus VA1 no requiere que su proteína de cápside sea procesada por tripsina para ser infeccioso. Sin embargo, este virus sí requiere que su proteína precursora de cápside sea procesada proteolíticamente, aunque, a diferencia de los HAstV clásicos, esto ocurre intracelularmente y el corte es mediado por una proteasa desconocida.

Para caracterizar el precursor de la cápside y los productos proteolíticos de VA1 generados por su procesamiento intracelular, se hicieron anticuerpos policlonales de conejo contra dos proteínas recombinantes producidas en *E. coli* y contra dos péptidos sintéticos. Estos inmunógenos se eligieron, con base en lo que se conoce del procesamiento de la proteína precursora de HAstV clásicos, para generar anticuerpos que reconocieran específicamente i) el dominio *core* (anticuerpo DB), aunque su caracterización posterior demostró que este anticuerpo

también reconoce un fragmento de la espícula, ii) un fragmento del *core* (α -*core*), iii) al dominio de la espícula (α -espicula) y, iv) al carboxilo terminal (α -COOH) de la proteína precursora. Estos anticuerpos permitieron definir, por ensayos de inmunoblot de células infectadas o no con VA1, así como mediante el análisis del virus purificado, que la proteína precursora de la cápside es de 86 kDa (VP86), la cual se procesa proteolíticamente de manera intracelular para dar el virión maduro, infeccioso, compuesto del *core* de 34 kDa (VP34) y la espícula de 38 kDa (VP38). Esto último se confirmó mediante la secuenciación del extremo N-terminal de la proteína de 38 kDa, que comienza en el aminoácido Thr-388 del ORF2. El *core* parece tener dos intermediarios estables durante su procesamiento, de 36 y 41 kDa. La localización de VP34 y VP38 dentro de la proteína precursora, al igual que una aproximación de la identificación de los extremos amino y carboxilo de ambas proteínas se obtuvo por un análisis exhaustivo por espectrometría de masas del virus purificado. Esto permitió identificar una región *linker*, de aproximadamente 50 aminoácidos entre el dominio del *core* y el de la espícula, que se pierde durante el procesamiento.

Para evaluar si el procesamiento es necesario para activar la infectividad del virus, probamos diferentes inhibidores, que en conjunto bloquean la actividad de los siete grupos de proteasas conocidos. Encontramos que el inhibidor de proteasas de serina, AEBSF, disminuye el procesamiento de la proteína de la cápside y abate la infectividad del astrovirus VA1. Estos datos sugieren que el procesamiento es necesario para activar la infectividad.

Para determinar si la proteasa que procesa intracelularmente VP86 es de origen viral o celular expresamos el ORF2 de VA1, que codifica a VP86, en células HEK 293T, que son susceptibles a la infección de VA1, aunque 20 veces menos que las células Caco-2. La proteína se expresó de manera clara, pero sorprendentemente, la proteína precursora no se procesó en las células HEK, lo cual sugiere que la proteasa de serina viral, codificada en el ORF1a del virus, y no

presente en la construcción que expresaba el ORF2, está involucrada en el procesamiento. Para tratar de confirmar esta posibilidad, clonamos el ORF1a de VA1 para co-expresarlo en las células HEK, junto con el ORF2. Interesantemente, tampoco detectamos que la proteína producida por el ORF2 se procese en presencia del ORF1a. La infección por astrovirus, al igual que otros virus de RNA de una sola cadena, de polaridad positiva, provoca una remodelación importante de sistema membranosos celular, necesario para su replicación. En este contexto, nuestros datos sugieren que para que el procesamiento ocurra podría requerirse del ambiente intracelular propiciado por la infección para inducir la expresión o el reclutamiento de una proteasa celular al sitio necesario al interior de la célula, o bien que la proteasa viral requiere también del ambiente generado en las células infectadas para poder llevar a cabo su función de procesamiento. Estamos en la actualidad siguiendo diversas estrategias alternativas a las descritas para poder dilucidar el origen de la proteasa encargada del procesamiento intracelular de la proteína precursora de la cápside de astrovirus neurotrópico VA1.

Los resultados obtenidos en esta tesis sientan las bases para profundizar en el estudio de la biología del astrovirus VA1, incluyendo el papel que juega el procesamiento de la poliproteína precursora en el ciclo de replicación. Este conocimiento será relevante para el eventual diseño de medidas de control para la infección causada por este virus, en particular para el tratamiento de los casos de encefalitis que, hasta ahora, han mostrado alta mortalidad.

II. INTRODUCCIÓN

I. Astrovirus

Los virus son parásitos intracelulares obligados capaces de producir enfermedades infecciosas. Los virus pertenecientes a la familia Astroviridae (derivado de la palabra griega “astron”, por su forma de estrella) se caracterizan por ser pequeños (~35 nm), no envueltos, de simetría icosaédrica, con un genoma de una sola cadena de RNA de sentido positivo.

Taxonómicamente, de acuerdo al *International Committee on Taxonomy of Viruses*, la familia Astroviridae está dividida en dos géneros: *Avastrovirus* y *Mamastrovirus*, con aves y mamíferos como sus huéspedes, respectivamente. Dentro del género *Avastrovirus* hay 3 especies, que infectan gallinas, patos y pavos. En el género *Mamastrovirus* hay 19 especies que infectan humanos, bovinos, ovinos, felinos, porcinos, visones, perros, venados, delfines, entre otros.

Actualmente se está redefiniendo la clasificación de las especies de ambos géneros. Según el análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside completa, los astrovirus de aves y mamíferos se dividen en dos genogrupos principales: genogrupo I y genogrupo II. Cada genogrupo incluye astrovirus que infectan a diferentes especies y se pueden subdividir en genotipos en función de la distancia genética y del huésped que infecta (Fig. 1). Es probable que esta nomenclatura experimente una mayor expansión en la medida que se han identificado nuevos genomas de astrovirus de muchos otros vertebrados, incluidos reptiles, anfibios, peces e invertebrados. También se han identificado genomas similares a “posibles” astrovirus de plantas (Fig. 2). La diversidad genética de los astrovirus es mucho mayor de lo que se conocía hasta hace apenas una década.

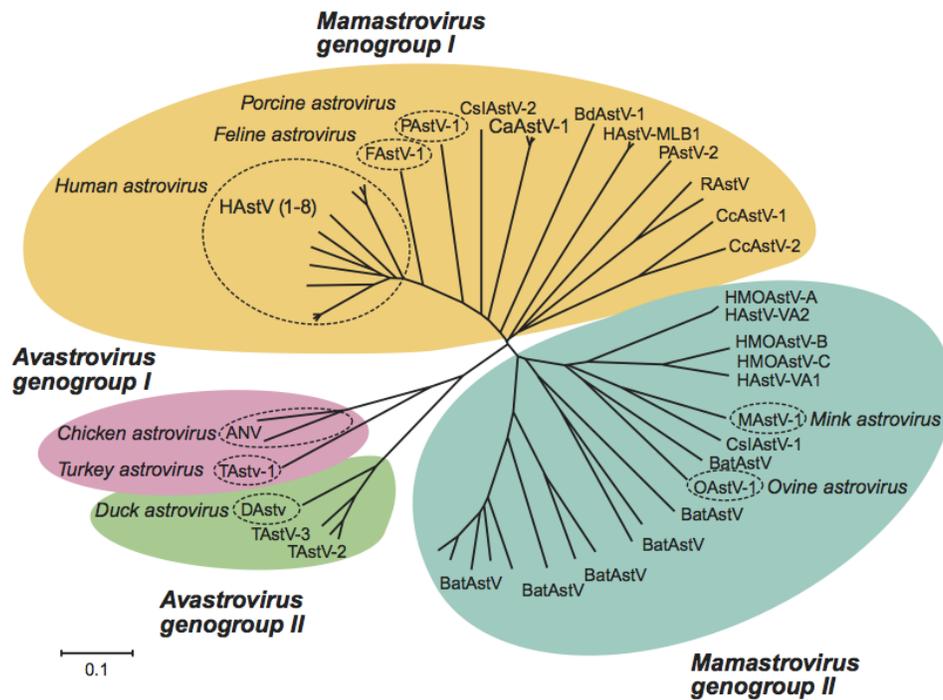


Figura 1. Relaciones filogenéticas dentro de la familia Astroviridae. Tanto astrovirus que infectan aves como los que infectan mamíferos se dividen en genogrupos I y II. La clasificación de los genotipos está basada en la secuencia de aminoácidos del ORF2 (1).

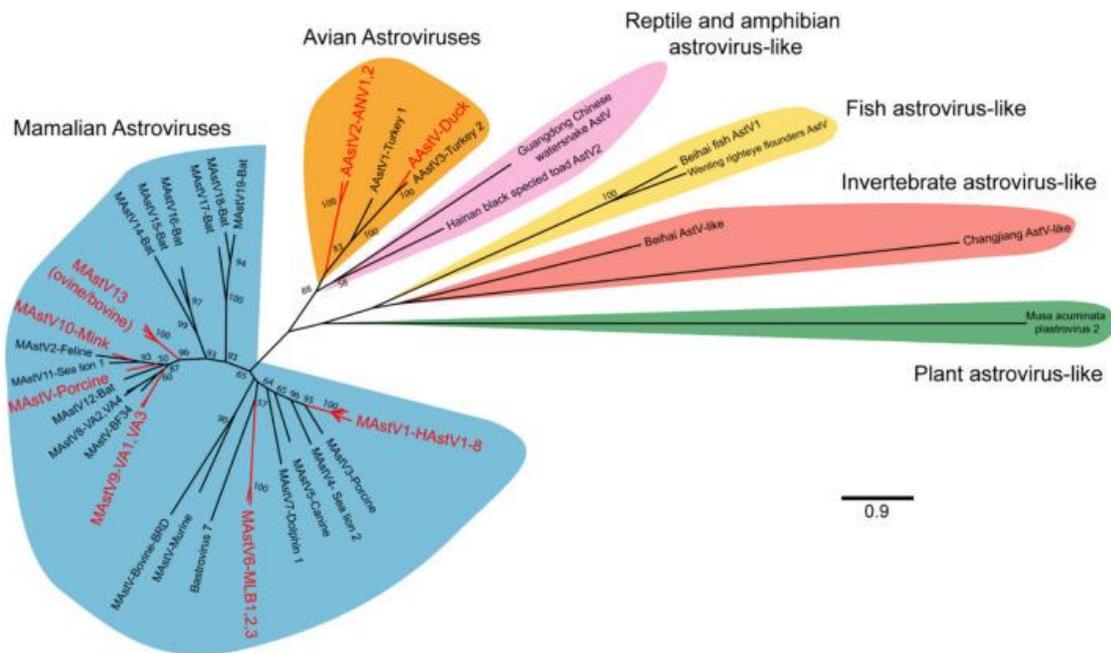


Figura 2. Relaciones filogenéticas de astrovirus reconocidos por la ICTV y genomas de "posibles" astrovirus. La filogenia está hecha con la secuencia de aminoácidos del ORF2 (2). En rojo se marcan las especies implicadas en infecciones extra intestinales.

II. Astrovirus de humanos

Los astrovirus fueron descubiertos en 1975, en una muestra fecal de niños hospitalizados con diarrea y vómito analizada por microscopía electrónica (3); desde entonces estos virus han sido reconocidos como un agente causal de gastroenteritis a nivel mundial, provocando del 2 al 9% de las gastroenteritis no bacterianas (4). Los astrovirus son transmitidos por la vía fecal-oral y afectan principalmente a niños en los primeros años de vida, a personas mayores y a personas inmunocomprometidas (5). Recientemente se han observado casos de encefalitis asociados con astrovirus en pacientes inmunocomprometidos (6).

De las especies de astrovirus que infectan humanos, la especie *Mamastrovirus 1* (MAstV-1) incluye a los astrovirus clásicos del serotipo 1 al 8 (HAstV 1 al 8), los cuales fueron aislados a partir de muestras fecales. En cuanto a la incidencia de diferentes serotipos, HAstV-1 es el serotipo más prevalente en todo el mundo, representando más del 50% de los casos en todos los informes recientes, mientras que el segundo más frecuente difiere según las localizaciones geográficas (7).

Desde el 2008, la llegada de la secuenciación de nueva generación (NGS) y el análisis metagenómico han llevado a la identificación de numerosas cepas novedosas consideradas HAstV "no clásicos". Actualmente, los nuevos HAstV se clasifican dentro de las especies MAstV-6 (MLB1–3) ("MLB" quiere decir Melbourne), MAstV-8 (VA2/HMO-A, VA4, VA5, BF34) y MAstV-9 (VA1/HMO-C, VA3/HMO-B) ("VA" quiere decir Virginia y "HMO" Human-Mink-Ovine-like-Astrovirus). Estudios serológicos en EUA han reportado una alta prevalencia en adultos de anticuerpos contra HAstV-MLB1 y HAstV-VA1 (HMO-C) (86% y 65% a 78%, respectivamente) (8–10). Es importante mencionar que los nuevos astrovirus identificados están más cercanos filogenéticamente a los de origen animal que a los de humanos clásicos (Figuras 1 y 2).

III. Astrovirus neurotrópicos

Hasta la fecha se han identificado 12 casos de infección del sistema nervioso central (SNC) por HAstV en humanos, especialmente en pacientes inmunocomprometidos o inmunosuprimidos, aunque recientemente se describió un caso de encefalitis por HAstV-1 en un paciente inmunocompetente (11). La cepa identificada con mayor frecuencia ha sido VA1 con 7 casos reportados hasta la fecha (Tabla 1). Este virus se describió originalmente en 2009, en un brote de gastroenteritis en una guardería de niños en Virginia, EUA (12). Además de VA1, se han reportado casos de HAstV-4, HAstV-MLB1, HAstV-MLB2 y HAstV-1.

Tabla 1. Casos reportados de encefalitis por el astrovirus VA1.

Autor y año	Sexo, Edad	Diagnóstico	Tipo de infección	Muestras con detección de astrovirus	Tratamiento	Resultado
[8]	Masculino, 15 años	Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X.	Encefalitis	Cerebro	Ninguno	Fatal
[9]	Masculino, 18 meses	Inmunodeficiencia hereditaria. Trasplante alogénico de células madre.	Encefalitis	Cerebro, LCR, heces, suero	Ninguno	Fatal
[10]	Masculino, 42 años	Leucemia linfocítica crónica. Trasplante alogénico de células madre.	Encefalitis	Cerebro, LCR	IVIG, ribavirina	Fatal
[11]	Masculino, 14 años	Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X.	Encefalitis	Cerebro	IVIG, esteroides, ribavirina PEG-INF alpha-2b	Vivo
[12]	Femenino, 11 años	Leucemia mieloide aguda. Trasplante alogénico de células madre.	Encefalitis	Cerebro	Ninguno	Fatal
[13]	Masculino, 15 años	Leucemia mieloide aguda. Trasplante alogénico de células madre.	Encefalitis	Cerebro	Ninguno	Vivo
[14]	Femenino, 2 años	Leucemia linfoblástica	Encefalitis	LCR	IVIG, esteroides, ribavirina PEG-INF alpha-2b nitazoxinida	Vivo
[14]	Masculino, 9 años	Leucemia mieloide	Encefalitis	LCR	IVIG nitazoxanida	Fatal

IV. Genoma de los astrovirus

Los astrovirus tienen un genoma de una sola cadena de RNA de sentido positivo de aproximadamente 6 a 8 kb (Fig. 3). El genoma incluye regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' (1). La región no traducida del extremo 3' contiene una estructura secundaria conservada nombrada como *stem-loop II motif*, cuya función no ha sido determinada, pero se cree que mantiene la estabilidad de la estructura secundaria del RNA e interactúa con proteínas virales y celulares esenciales para la replicación (13). El genoma del virus no tiene una estructura de cap en el extremo 5', pero sí una proteína ligada covalentemente a este extremo llamada VPg. En el extremo 3' se encuentra una cola de poli (A). El genoma tiene tres marcos abiertos de lectura (ORFs) superpuestos, denominados ORF1a, ORF1b y ORF2. Las longitudes de los ORFs son variables, según el tropismo de la especie del virus, el subtipo del virus y si el virus se ha adaptado a crecer en cultivo celular (14, 15).

Hacia el extremo 5' del genoma se encuentran los ORFs 1a y 1b, los cuales codifican para las proteínas no estructurales del virus. Entre ambos ORFs se localiza una estructura de tallo-asa (*hairpin*) que permite que ambos ORFs se traduzcan juntos por un cambio de marco de lectura (*frameshift*). El ORF1a produce a la poliproteína nsp1a que incluye una proteasa de serina y la proteína ligada al genoma viral (VPg). Por otro lado, el ORF1b produce la polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp). En el extremo 3' del genoma el ORF2 codifica las proteínas estructurales del virus, las cuales se sintetizan a partir de un RNA subgenómico (Fig. 3).

Usando genómica comparativa, se identificó un cuarto ORF (ORFX) en algunos astrovirus, que codifica por una proteína funcional, denominada proteína XP. El ORFX se superpone a la región 5' del ORF2 que codifica la cápside y se ha propuesto que se traduce a través de un mecanismo conocido como *leaky scanning* del ribosoma. Se demostró que esta proteína se asocia con la membrana plasmática

con un dominio N-terminal extracelular y promueve la salida eficiente del virus al provocar la permeabilización de la célula, sugiriendo que es un tipo de viroporina, sin embargo, los astrovirus del genogrupo IIa, como el astrovirus VA1, carecen de este ORFX (16, 17).

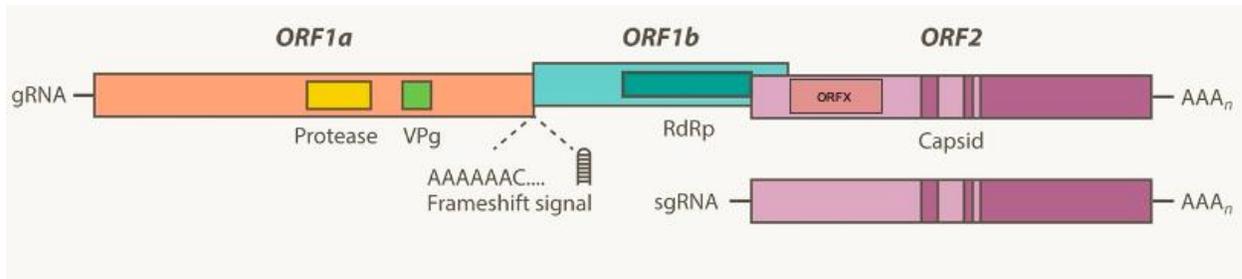


Figura 3. Organización del genoma de los astrovirus clásicos. El genoma consta de tres marcos abiertos de lectura (ORFs) que se superlapan. El ORF1a y el ORF1b codifican para proteínas no estructurales y el ORF2 para proteínas estructurales. El ORFX que se superlapa con el ORF2 codifica para la proteína XP que actúa como una viroporina en los astrovirus clásicos (18).

V. Estructura de los astrovirus

Los estudios estructurales que combinan cristalografía de rayos X, microscopía electrónica, criomicroscopía y ultracentrifugación por densidad han permitido avances importantes en la estructura de los astrovirus (Fig. 4).

La estructura de los viriones se ha determinado a una resolución de 25 Å por criomicroscopía electrónica (Fig. 4), observándose que el virus tiene una estructura icosaédrica de simetría de T=3. Existen dos formas de los viriones. La primera está representada por los viriones inmaduros, en la que se observa el centro (*core*) de la partícula viral decorada con 90 espículas globulares (Fig. 4A), mientras que la forma madura muestra sólo 30 espículas (Fig. 4B). Este paso de maduración ocurre cuando el virión inmaduro es tratado con tripsina, perdiéndose 60 espículas durante este proceso, que está asociado a la activación de la infectividad del virus. Las partículas maduras e inmaduras tienen un diámetro de ~43 nm, de los cuales ~35nm corresponden al *core* interno (19).

La partícula inmadura del astrovirus de humano serotipo 8 (HAstV-8), no procesada proteolíticamente, contiene 180 copias de la proteína precursora de la cápside de 70 kDa (VP70). Esta proteína precursora se corta por tripsina para dar los viriones maduros e infecciosos, que están formados por dos proteínas resultado del procesamiento proteolítico: el *core* de 34 kDa (VP34) y la espícula de 27 kDa (VP27) (Fig. 4B).

La estructura de la proteína del *core* se resolvió por cristalografía de rayos-X a 2.15 Å de resolución (Fig. 4C), y se encontró que está organizada en dos dominios llamados S (*core* interno) y P1 (*core* externo). El dominio S tiene un plegamiento de barril β tipo *jelly-roll* y el dominio P1 tiene un plegamiento tipo barril β (20). La estructura de la proteína que forma las espículas virales, VP27, también se resolvió por cristalografía de rayos-X a 1.8 Å de resolución, encontrándose que esta se estructura como dímero. Cada monómero se conforma de tres láminas β en forma de sandwich (21). VP27 se encuentra antes del final de la hebra β del dominio de *core*, lo que probablemente permite a la espícula mantenerse unido al *core*.

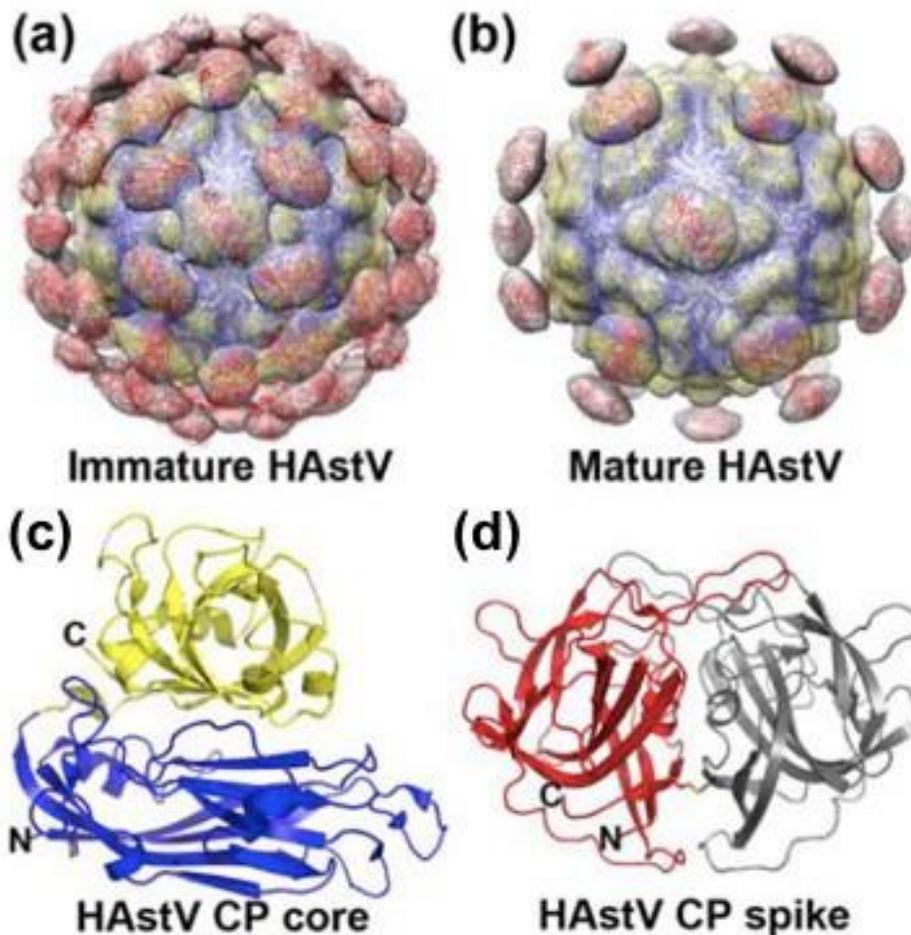


Figura 4. Crio-microscopía electrónica de la partícula viral y estructura cristalográfica de las proteínas de cápside de HAstV clásicos. (a) modelo del virión inmaduro T=3 obtenido por crio-microscopía electrónica; (b) modelo del virión maduro T=3 digerido con tripsina obtenido por crio-microscopía electrónica; (c) estructura cristalográfica del dominio del core de HAstV-1, en amarillo el core externo (P1) y en azul el interno (S); (d) estructura cristalográfica del dímero del dominio de espícula (22).

VI. Ciclo de replicación

I. Entrada y unión

A pesar de los avances en los últimos años, aún se desconoce con totalidad el ciclo de replicación, incluso para los astrovirus clásicos (Fig. 5). La replicación comienza con la unión del virus maduro al receptor de la célula. Se desconoce el receptor o receptores celulares para los astrovirus, sin embargo, la estructura cristalográfica de la espícula mostró una composición de residuos polares conservados, especialmente aminoácidos con carga positiva/negativa,

característico de sitios de unión a un receptor de oligosacáridos, lo que sugiere que los astrovirus de humano utilizan una molécula de polisacárido como receptor celular. Sin embargo, a pesar de que se ha probado heparina, heparán sulfato o dextrán sulfato para bloquear la infectividad de HAstV-8, sólo se ha podido observar un bloqueo parcial de su infectividad. Este resultado refuerza, aunque no prueba de manera definitiva, que una molécula de azúcar puede funcionar como un receptor celular o al menos se utiliza para el reconocimiento inicial de astrovirus en la célula (21).

Estudios muestran que el tiempo promedio para la unión del virus a la superficie celular es de 10 min y que, al utilizar drogas bloqueadoras del ensamble de clatrina (clorpromazina y dansilcadaverina), integridad del citoesqueleto (citocalasina D y jasplakinolido) y acidificación del endosoma (bafilomicina A1), se inhibe la infectividad de HAstV-8 en células Caco-2. Estos resultados sugieren una ruta de entrada endocítica mediada por clatrina, dependiente del citoesqueleto de actina y la acidificación de endosomas. Esto se confirmó al disminuir la expresión de la cadena pesada de clatrina mediante el sistema de interferencia de RNA (iRNA), y sobre-expresando mutantes dominantes negativos de dinamina 2 (GTPasa que está involucrada en la escisión de los endosomas de la membrana celular) y Eps15 (adaptador de proteínas que interactúan con clatrina durante la endocitosis) observando una disminución en la replicación de HAstV- 8 (23).

Cuando el virus entra a la célula, el RNA genómico es liberado al citoplasma. Se desconocen los factores virales o celulares implicados en este proceso. Se ha estimado que el tiempo medio de liberación del RNA genómico es de 130 minutos. Cuando se reduce la expresión de Rab7 utilizando iRNA, la infectividad de HAstV-8 disminuyó un 50%. Rab7 es una GTPasa involucrada en el proceso del tráfico vesicular, particularmente en la maduración de endosomas tempranos a endosomas tardíos, lo que sugiere que el virus debe llegar al endosoma tardío para liberar su genoma (23).

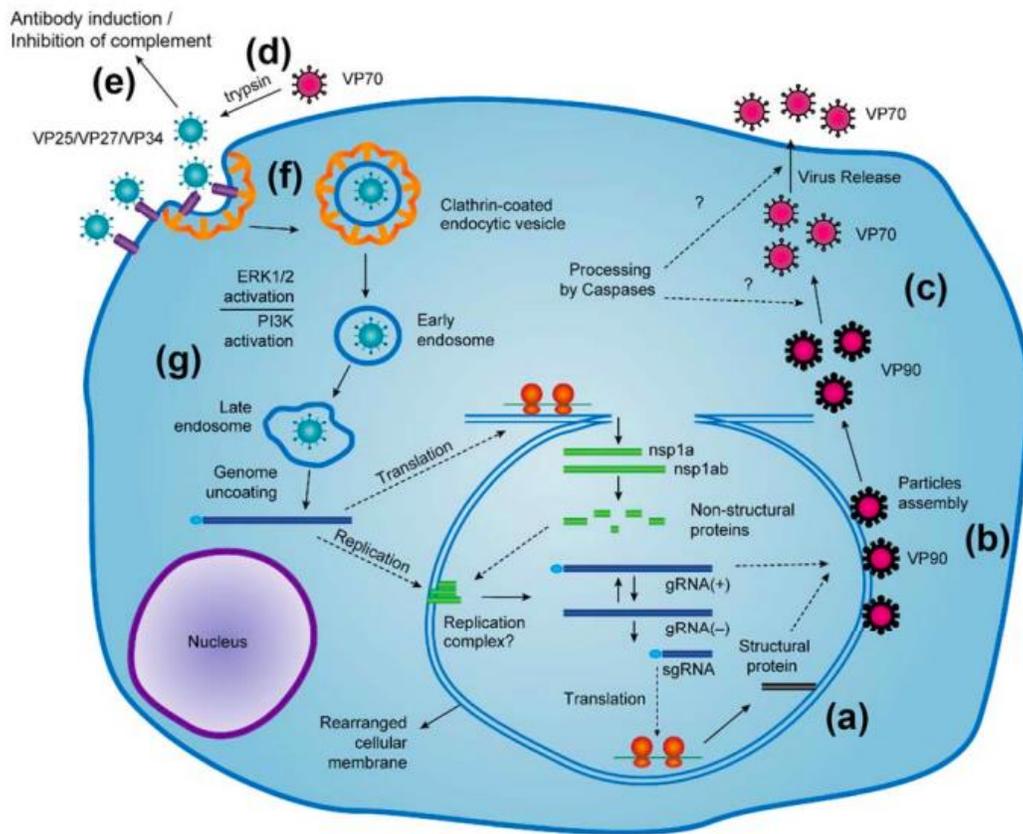


Figura 5. Ciclo de replicación de los astrovirus clásicos. (a) Síntesis de la poliproteína precursora de la cápside VP90, de 90 kDa, a partir del RNA subgenómico (sgRNA), (b) Ensamble de las proteínas VP90 (180 copias) con el genoma viral de RNA en partículas de HAstV, (c) Corte de la proteína VP90 mediado por caspasas para formar VP70 y de manera posterior, la liberación de las partículas de HAstV inmaduras, (d) Corte realizado por una proteasa extracelular (in vitro se utiliza tripsina) para producir partículas infecciosas de HAstV maduras conformadas por VP34 y VP27, (e) Las partículas extracelulares de HAstV inducen la producción de anticuerpos e inhiben la activación por complementación del huésped, (f) Unión y endocitosis mediada por clatrina de las partículas de HAstV, (g) Liberación del genoma del virus en el endosoma tardío. La replicación del virus ocurre asociada a membranas (22).

II. Traducción y replicación del genoma

Una vez que se libera el RNA genómico, éste es utilizado como molde para sintetizar las poliproteínas no estructurales nsp1a y nsp1ab. Nsp1a está codificado en el ORF1a, mientras que nsp1ab se traduce a partir del ORF1a y ORF1b a través de un mecanismo de cambio de lectura. El largo del ORF1a varía entre los astrovirus de mamífero (1). El ORF1a codifica un dominio putativo de helicasa (HEL), varios dominios transmembranales (TM) y de *coiled-coil* (CC), el dominio de proteasa (PRO), una proteína unida al genoma (VPg), una región hipervariable (HVR), una

señal de localización nuclear (NLS) y un dominio de muerte putativo (DD). Es importante señalar que experimentalmente sólo se han podido identificar la proteasa y la VPg. El ORF1b codifica la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) (Fig. 6).

El proceso de corte de las poliproteínas no estructurales del virus, llevado a cabo por la proteasa viral y por una proteasa celular no identificada, está poco caracterizado. Los estudios realizados con varios HAstV clásicos muestran diferentes productos intermedios y finales. Se ha identificado en la poliproteína Nsp1a varios dominios putativos transmembranales que podrían ayudar a anclar los complejos de replicación no estructurales en las membranas celulares (24). Se desconoce si el procesamiento proteolítico de las poliproteínas no estructurales tiene lugar antes o después del anclaje a las membranas intracelulares, pero en estudios *in vitro* se ha observado reordenamientos de membrana en células infectadas con HAstV (25, 26). Se ha visto que tanto las proteínas no estructurales como el RNA viral co-localizan con el retículo endoplásmico y se ha predicho una señal de retención del retículo endoplásmico al final de Nsp1a (26), por lo que se cree que las membranas intracelulares derivadas del retículo endoplásmico serían el sitio celular para replicación del genoma de los astrovirus.

Se han sugerido al menos 4 sitios de corte para la poliproteína Nsp1a, lo que puede generar 4 posibles productos Nsp1a/1, Nsp1a/2, Nsp1a/3 y Nsp1a/4. La proteína Nsp1a/3 codifica para una proteasa de serina que está encargada de algunos de los cortes proteolíticos de la poliproteína, resultando en las proteínas no estructurales individuales. La estructura cristalográfica de la proteasa viral se ha resuelto a 2.0 Å de resolución, mostrando una tríada catalítica Asp-His-Ser típica de las proteasas de serina. A pesar de que se logró probar que la proteína es catalíticamente activa, no se logró ver actividad *in trans* (27). Por otro lado, la proteína Nsp1a/4 contiene el dominio de muerte (DD), la secuencia de localización nuclear (NLS), un dominio para la proteína viral ligada al genoma (VPg) y una región

hipervariable (HVR). La función de los otros productos de corte de Nsp1a no han sido caracterizados.

Se identificó una proteína ligada al genoma viral (VPg) unida covalentemente al extremo 5' del genoma a través de un enlace fosfodiéster, que es esencial para la infectividad del virus, ya que una mutación puntual en esta región inhibe su replicación (28).

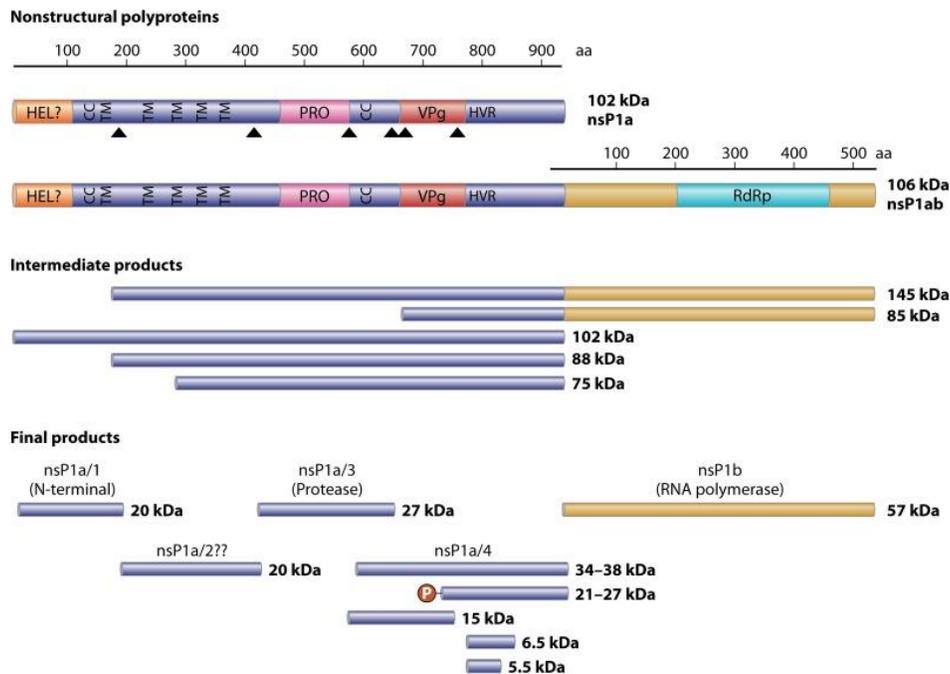


Figura 6. Procesamiento putativo de las proteínas no estructurales codificadas en el ORF1a y ORF1b. En morado los productos de procesamiento del ORF1a y en amarillo los productos de procesamiento del ORF1b. HEL, dominio putativo de helicasa; CC, dominio de coiled-coil; TM, dominios transmembranales; PRO, dominio de proteasa, VPg, proteína viral unida al genoma; HVR, región hipervariable; RdRp, RNA polimerasa dependiente de RNA, P, fosforilación post-traduccional. Los triángulos muestran posibles sitios de corte proteolítico. Modificado de (4).

La traducción de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) ocurre a través de un mecanismo de cambio de marco ribosomal -1 (*frameshift*) en la región superpuesta entre el ORF1a y el ORF1b. Esta señal está dada por una secuencia heptamérica (A₆C) y una estructura de tallo-asa, las cuales están conservadas en

los astrovirus clásicos y los nuevos astrovirus de humano (17, 29). La proteína obtenida, Nsp1ab, es procesada co-traduccionalmente en el amino terminal por una posible proteasa celular para formar la proteína nsp1b (30).

Una vez sintetizadas las proteínas no estructurales del virus, estas funcionan para replicar el RNA viral. El proceso de replicación no ha sido caracterizado en detalle, pero se puede inferir a partir de otros virus con cadena sencilla de RNA de polaridad positiva. En consecuencia, inicialmente se sintetiza una copia completa del RNA genómico (RNAg), que se conoce como RNA antigenómico (RNAag), de polaridad negativa. Este RNAag se utiliza a la vez como molde para la producción de dos formas de RNA de polaridad positiva, una correspondiente al RNAg y otra al RNA sub-genómico (RNAsg). Este RNAsg sirve como RNAm para dirigir la síntesis de las proteínas estructurales del virus. Aún se desconocen otros aspectos del proceso de replicación, como: ¿cuál es el papel que juega la proteína VPg en la traducción y replicación del RNAg?, así como el mecanismo que utiliza el virus para cambiar del modo “replicación” (síntesis del RNAag) al modo “transcripción” (síntesis del RNAg) (31). Existen algunos ejemplos de proteínas celulares que interactúan con el RNA viral. Se ha observado que al utilizar iRNA contra genes involucrados en la síntesis de colesterol, síntesis de ácidos grasos y metabolismo del fosfatidilinositol e inositol fosfato disminuyen las cantidades de RNA genómico en HAsV-8. Sin embargo, aún se desconoce el papel de estas y de otras proteínas que pudieran estar involucradas en la replicación viral (32, 33).

III. Ensamble y salida

Las proteínas estructurales se sintetizan a partir del RNA sub-genómico, inicialmente como una poliproteína de 90 kDa (VP90), posiblemente a través de un mecanismo que involucra la presencia de VPg en el extremo 5' del RNAsg (28). La mitad N-terminal de VP90 es menos variable que la mitad C-terminal de la proteína. En los astrovirus clásicos, el modelo de morfogénesis sugiere que la poliproteína VP90 se ensambla en 180 copias formando viriones inmaduros intracelulares (19, 34) y que está es procesada por las caspasas 3 y 9 cerca del extremo C-terminal, resultando en las cápsides virales inmaduras extracelulares de 70 kDa (VP70) (35). El procesamiento por caspasas es importante para que el virus pueda salir de la célula infectada; la inhibición de la actividad de las caspasas inhibe el procesamiento y reduce drásticamente la liberación de las partículas virales (34, 35).

Se sugiere que el mecanismo de liberación de las partículas inmaduras ocurre por un mecanismo no-lítico, a través de vesículas autofágicas o de alguna forma de desestabilización de la membrana celular como sería el caso de la proteína XP que actúa como una viroporina (16, 22). Además, se ha observado que la infección con HAstV estimula la secreción de vesículas extracelulares y el virus parece unirse a ellas (36). Una vez fuera de la célula, las partículas inmaduras formadas por VP70 son procesadas por proteasas extracelulares para producir partículas maduras e infecciosas de astrovirus. En cultivo celular, la maduración de las partículas se obtiene por medio de la proteólisis con tripsina, la cual aumenta la infectividad viral hasta 10^5 veces (37). Como se mencionó anteriormente, la proteólisis por tripsina resulta en el procesamiento de la poliproteína VP70 para dar finalmente 2 polipéptidos, VP34 y VP27, que constituyen el virión infeccioso maduro (38). La proteína VP34 es derivada del dominio N-terminal conservado de la poliproteína VP70 y forma la cápside; por otro lado, VP27 proviene de la región hipervariable y forma las espículas de la superficie de la cápside (Fig. 7) (37).

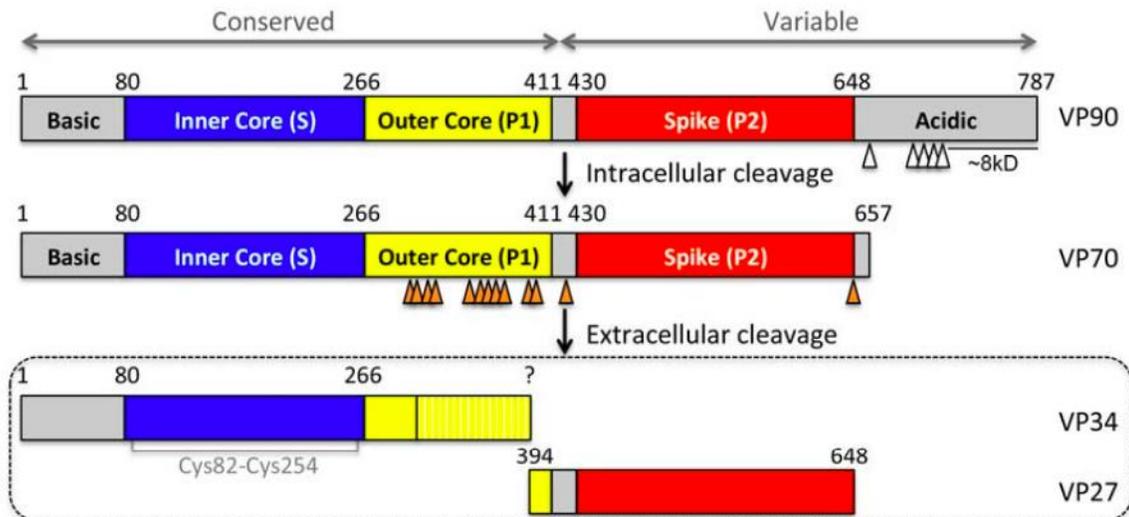


Figura 7. Esquema del procesamiento proteolítico de la poliproteína VP90 en los astrovirus clásicos. La proteína VP90, traducida a partir del RNA subgenómico, es procesada por caspasas intracelulares (flechas blancas) para producir la proteína VP70 y permitir la salida del virus de la célula. La proteína VP70 es procesada por proteasas extracelulares (flechas naranjas), tipo tripsina, para producir a las proteínas que conforman la partícula madura: VP34, VP27 y VP25 (22, 38)

A diferencia de lo que se ha demostrado previamente con los astrovirus clásicos, las caspasas no parecen estar involucradas en el procesamiento del precursor VP86 del astrovirus no clásico VA1. Si la proteasa involucrada en el procesamiento de VP86 es de origen celular o viral aún no se determina, aunque también es posible la participación de más de una proteasa (39).

III. ANTECEDENTES

En un brote agudo de gastroenteritis ocurrido en 2009 en una guardería de niños en Virginia, EUA, se analizó una muestra de heces por NGS encontrándose secuencias virales pertenecientes a la familia *Astroviridae* que mostraban poca identidad con los astrovirus clásicos (12). A esta cepa se le llamó VA1.

A pesar de que el virus VA1 fue descrito inicialmente en un brote de gastroenteritis, también se ha reportado que está asociado a casos de encefalitis, principalmente en personas inmunocomprometidas. Hasta la fecha se han reportado 7 casos de infección del sistema nervioso central por la cepa VA1. Janowski y colaboradores reportaron la adaptación del virus a crecer en la línea celular Caco-2 (40). De particular interés fue la observación de que VA1, a diferencia de los astrovirus clásicos, no requiere ser tratado con tripsina para activar su infectividad. Así, al ser propagado en esta línea celular, el número de copias de RNA viral en células infectadas con el virus tratado y no tratado con tripsina no fue significativamente diferente a lo largo de varios pases. En un trabajo previo (41) evaluamos lo que estaba ocurriendo con el procesamiento de la proteína de la cápside de VA1 y si las proteasas involucradas (caspasas y tripsina) en el ciclo de replicación de los astrovirus clásicos tenían un papel en la replicación de VA1. Los experimentos realizados utilizando el inhibidor Z-VAD mostraron que el precursor de la cápside de VA1 no es procesado por caspasas intracelularmente y la inactivación de estas proteasas celulares no afecta la progenie viral. También demostramos que la infectividad viral no se altera al tratar el virus purificado con tripsina, y que las proteínas que forman el virión maduro no son susceptibles al corte por esta proteasa, lo que es de esperarse, dado que el virus infecta naturalmente el tracto gastrointestinal donde hay presencia de tripsina.

De manera sorprendente, encontramos que a pesar de que el virus no requiere ser tratado con tripsina para ser infeccioso, la poliproteína precursora de la cápside del astrovirus VA1 sí se procesa proteolíticamente en algún momento

durante el ciclo de replicación del virus. Hicimos una caracterización preliminar del procesamiento de la proteína precursora utilizando anticuerpos dirigidos contra diferentes regiones de la proteína protectora que fueron generados con proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*. Desafortunadamente, dos de estas proteínas diseñadas para generar anticuerpos que reconocieran a la espícula y al extremo carboxilo terminal de la proteína precursora, no indujeron anticuerpos de buena calidad, lo cual no nos permitió llegar a una conclusión sobre el procesamiento de estas regiones. Debido a esto, tampoco se pudo caracterizar completamente a las proteínas que conforman el virión maduro.

IV. HIPÓTESIS

La proteína precursora de la cápside se procesa intracelularmente por la proteasa viral para dar origen a la forma infecciosa del astrovirus VA1.

V. OBJETIVO GENERAL

Avanzar en la caracterización de la vía y productos finales del procesamiento de la proteína precursora de la cápside del astrovirus VA1 y definir su papel en la activación de la infectividad viral. Asimismo, determinar el origen de la proteasa encargada de dicho procesamiento,

I. OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar el procesamiento de la proteína precursora de la cápside del astrovirus VA1.
- Caracterizar las proteínas que forman el virión maduro
- Determinar si el procesamiento de la proteína de la cápside es necesario para que el virus sea infeccioso.
- Definir si la proteasa que procesa la proteína precursora de la cápside viral del astrovirus VA1 es de origen celular o viral.

VI. METODOLOGÍA

I. Células y virus

La línea celular Caco-2 (células de adenocarcinoma colorectal humano), clona de C2BBE1, obtenida a partir de la *American Type Culture Collection* (ATCC) se utilizó en este trabajo. Las células se crecieron en DMEM Advanced (*Dulbecco's modified Eagle's medium-reduced serum*) (Gibco Cat. 12491015) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) y 2 mM de glutamina (Gibco Cat. 11539876) a 37°C en una atmósfera de 10% de CO₂.

La línea celular HEK 293T T7 (células embrionarias de riñón humano), expresa constitutivamente la polimerasa del fago T7 en citoplasma. Se creció bajo una atmósfera de 5% de CO₂, a 37°C, en las mismas condiciones que las células C2BBE1.

La cepa de astrovirus VA1 (VA1/HMO-C) fue amablemente donada por David Wang (Universidad de Washington). Se propagó en células Caco-2. Se infectaron células Caco-2 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.01 a 0.001 y se incubó a 37°C durante 1 h con una atmósfera de 10% de CO₂ para permitir la adsorción del virus. Posteriormente, se dejó el inoculó y se adicionó DMEM HG (*Dulbecco's modified Eagle's médium High Glucose*) +10% SFB y se incubó bajo una atmósfera de 10% CO₂ durante 5 a 7 días. Las células se congelaron y descongelaron tres veces, y se determinó el título viral por medio de un ensayo inmunoperoxidasa para detectar el número de focos infecciosos como se describe en la siguiente sección. El lisado de las células infectadas (stock viral) se alicuotó y almacenó a -70°C.

II. Anticuerpos

En este trabajo se emplearon varios anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra el ORF2 del astrovirus VA1 (número de acceso a GenBank NC_013060.1). El anticuerpo DB se generó contra una proteína que comprende los aminoácidos 71 al 403 del precursor de la cápside viral y el α -core contra una proteína que contiene los aminoácidos 180 al 300 fusionada a la glutatión S-transferasa (GST), usando el

vector pGEX-4T-1 (Pharmacia). Ambas proteínas se sintetizaron en *E. coli* (42), se purificaron y se utilizaron para generar un suero hiperinmune en conejos Nueva Zelanda, como se reportó anteriormente (43). El anticuerpo α -proteasa NH₂ está dirigido contra la región del ORF1a comprendida entre los aminoácidos 420 al 581 y se sintetizó en *E. coli* como fusión con la proteína glutatión S-transferasa (GST), usando el vector pGEX-4T-3 (Pharmacia). El suero hiperinmune se produjo como se mencionó anteriormente. Los tres anticuerpos mencionados anteriormente se realizaron en el laboratorio. Además, se obtuvieron dos péptidos sintéticos y sus correspondientes anticuerpos de conejo de la compañía GeneScript. Estos péptidos representan los aminoácidos del ORF2 559-VLSEPEDFDVVQKS-572 (anticuerpo α -Espícula) y 745-AIAVKKKLRRGHAE-758 (anticuerpo α -COOH). Los anticuerpos contra HAstV-8, cepa Yuc-8, han sido reportados (37).

III. Ensayo de infectividad

El título viral se determinó por medio de un ensayo de inmunoperoxidasa, según lo descrito por Méndez y colaboradores (37). Se crecieron células Caco-2 en cajas de 96 pozos hasta que se formó una monocapa confluyente. La monocapa se lavó 2 veces con MEM (*Minimum Essential Medium*) y se infectaron con 50 μ l del lisado viral de interés con diluciones seriadas dobles por 1 hora a 37°C. El virus que no se adsorbió se removió y se incubaron las células durante 48 h a 37°C en un ambiente con 10% de CO₂. Posteriormente se lavó la monocapa con 100 μ l de PBS, se fijó con una solución de formaldehído al 2.5% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS 1x. Después, la membrana de las células se permeabilizó con una solución de Tritón X-100 (Sigma) al 0.2% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Nuevamente se lavó la monocapa 3 veces con PBS y se añadió el anticuerpo primario monoclonal producido en ratón contra el astrovirus VA1 (2A2 diluido 1:1000) Posteriormente se añadió la proteína A acoplada a peroxidasa, diluido 1:3000 para detectar el anticuerpo primario. El anticuerpo primario se incubó a 4°C toda la noche y la proteína A durante 1 h a 37°C, ambos

se lavaron tres veces con PBS. Por último, se adicionó el sustrato de peroxidasa (50 µl por pozo que contiene 1 mg/ml de 3-amino-9-ethyl carbazol (AEC), 0.04% H₂O₂, y buffer de acetato de sodio (50 mM, pH 5). Una vez que se observó coloración en las células estas se lavaron con agua 2 veces y se contaron las unidades formadoras de focos (uff/ml) con un objetivo de 20x en un microscopio invertido Nikon TMS.

IV. Western blot

La muestra de interés se mezcló con amortiguador de carga (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, 2% SDS, 0.1% de azul de bromofenol, 10% glicerol, 1% β-mercaptoetanol) y se hirvió por 5 minutos.

Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) a 130 mA por 1 h. Posteriormente, la membrana se bloqueó durante 1 h con leche descremada (Carnation) al 5% en PBS-Tween al 0.1%. La membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en leche descremada al 1% en PBS-Tween al 0.1%, durante toda la noche a 4°C en agitación. La membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween al 0.1% durante 10 min cada lavado y se añadió el anticuerpo secundario (α-IgG de conejo acoplado a peroxidasa, diluido 1:3000) por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó la membrana 5 veces con PBS-Tween al 0.1% durante 10 min cada lavado. Se detectaron las proteínas utilizando el sistema *Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus* (PerkinElmer) exponiéndose a una película hipersensible Kodak.

V. Purificación de astrovirus VA1

Se crecieron células Caco-2 en 6 platos de 150 mm hasta alcanzar confluencia y se infectaron con VA1 a una MOI de 5 durante 48 h a 37°C. Transcurrido el tiempo se colectaron el medio y las células y se centrifugó por 10 min a 2,000 x g. El sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en Tritón-X100 al 1% en buffer

TNE (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA), se incubó durante 30 min en hielo y se agitó cada 5 min. Los tubos se centrifugaron a 2,000 x g durante 10 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a tubos opacos de polipropileno de 5 ml (Beckman). Los tubos se centrifugaron a 70,000 x g por 16 h a 4°C. Finalmente, el pellet de la última centrifugación se resuspendió en de buffer TNE y se sonicó para solubilizar el pellet. La muestra se centrifugó a través de 1 ml de sacarosa al 30% en buffer TNE a 200,000 x g por 2 h a 4°C. El virus presente en el pellet se purificó por densidad en gradientes de CsCl. Para esto, el pellet se resuspendió en 4 ml de TNE, se sonicó y se le añadieron 2.4 g de CsCl. Después se realizó una centrifugación a 160,000 x g por 18 h a 4°C y se colectó la banda opalescente correspondiente a las partículas virales; esta se diluyó a un volumen final de 5 ml de TNE y se centrifugó a 200,000 x g por 2 h a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en 400 µl de TNE.

VI. Caracterización del procesamiento de la proteína precursora de la cápside

Para caracterizar el procesamiento de la proteína precursora de la cápside se infectó con el astrovirus VA1 una monocapa de células Caco-2 en una placa de 6 pozos a una MOI de 5 durante 48 h a 37°C. Transcurridas las 48 h se quitó el sobrenadante y se lisaron las células con 200 µl de buffer de Laemmli 1x. La muestra se hirvió durante 5 min y se realizó un Western blot para evaluar la interacción de las proteínas con 4 anticuerpos diferentes: uno dirigido contra el *core* y espícula (anticuerpo DB), uno contra el *core* (α -*core*), uno contra la espícula (α -Espícula) y uno contra el extremo C-terminal (α -COOH). Además, en este Western blot se incluyó una muestra de virus purificado y control de lisado de células Caco-2 (MOCK).

VII. Inhibidores de proteasas

Con el objetivo de confirmar si el procesamiento de la proteína de la cápside es necesario para que el virus sea infeccioso, se crecieron células Caco-2 en pozos de

48 y se infectaron con el astrovirus VA1 a una MOI de 5. Transcurridas 24 h de infección se agregaron por separado los siguientes inhibidores (Tabla 2): Bestatina 10 μ M (Sigma, B8385), Aprotinina 0.3 μ M (Sigma, A3428), Leupeptina 100 μ M (Sigma, L8511), Pepstatina A 10 μ M (Sigma, 77170), PMSF 1 mM (Sigma, P7626), E64 10 μ M (Sigma, E3132), AEBSF 1 mM (Sigma, A8456), EDTA 1 mM (Sigma, E65511) y cOmplete ultra (coctel de inhibidores de proteasas) 1:100 (Roche, 05892988001) y se incubaron por 12 h a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 10%. La monocapa se lavó una vez con PBS y a todas las condiciones anteriores se les agregó cóctel de inhibidores de proteasas. Se congelaron y descongelaron tres veces las células y las muestras se analizaron por Western blot.

Tabla 2. Inhibidores de proteasas y sus características

Inhibidor	Función	Permeabilidad	Concentración de trabajo
Hidrocloreuro de bestatina	Inhibidor de aminopeptidasas	Se desconoce	1-10 μ M
Aprotinina	Inhibidor de serín proteasas (reversible)	No permeable	0.01-0.3 μ M
Leupeptina	Inhibidor de serín y cisteín proteasas (reversible)	No permeable o permeable, depende de la fuente	10-100 μ M
Pepstatina A	Inhibidor de proteasas aspárticas (reversible)	Poca permeabilidad	1-10 μ M
PMSF	Inhibidor de serín proteasas (irreversible)	No permeable o permeable, depende de la fuente	1, 2 y 3 mM
E64	Inhibidor de cisteín proteasas (irreversible)	Permeable	1-10 μ M
AEBSF	Inhibidor de serín proteasas (irreversible)	Permeable	0.1-1 mM
EDTA	Inhibidor de metaloproteasas	Permeable	1-10 mM
complete Ultra (Cóctel de inhibidor de proteasas)	Inhibe de serín, cisteín, aspárticas y metaloproteasas	Mixto	1x

VIII. Construcción de la clona pT7CF1-ORF2

Para identificar la identidad de la proteasa involucrada en el procesamiento de la proteína precursora de la cápside, se clonó en el vector pT7CF1-CHis, el cual está controlado por el promotor del fago T7 el ORF2 (proteína precursora de la cápside) de VA1 (Fig. 8).



Figura 8. Representación de la clona pT7-ORF2 VA1. En naranja se encuentra el promotor del fago T7, el cual da inicio a la transcripción mediada por la polimerasa del fago T7. En gris está el IRES o sitio interno de entrada del ribosoma. En azul se encuentra el ORF2 de 2277 pb seguido por una cola de poli adeninas, y por un terminador de la transcripción.

Para esto se diseñaron oligonucleótidos para amplificar por PCR el ORF2 que se encontraba parcialmente clonado en otro vector (ver la siguiente sección). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos sintetizados para la amplificación del ORF2 a partir de la clona parcial del genoma de VA1. Se muestra el tamaño del ORF2. En rojo está el sitio de corte para la enzima *NruI* y en verde el sitio de corte para el enzima *XhoI*.

Tamaño del gen amplificado	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido anti-sentido
2277pb	5' GATAATATCG↓CGATGGCT GGTAGGCAGCCCCAGC 3'	3' TATAATC↓TCGAGCTACTC GGCGTGGCCTCGG 5'

Amplificación del ORF2 a partir de la clona parcial del genoma de VA1 (pT7-ORF1b y ORF2 VA1)

Se amplificó el ORF2 a partir del plásmido pT7-ORF1b y OR2 VA1 utilizando los oligonucleótidos de la tabla 3. Se agregaron 500 ng del templado de DNA, 1 μ l de polimerasa Vent (NEB), 2 μ l de oligonucleótido sentido 10 μ M, 2 μ l de

oligonucleotido anti-sentido 10 μ M, 1 μ l dNTPs 12.5 mM, 5 μ l ThermoPol reaction buffer, 1.5 μ l MgSO₄ 100 mM y 37.5 μ l H₂O, en el siguiente programa:

Tabla 4. Programa de PCR utilizado para la amplificación del inserto.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	95° C	2 min
25 ciclos	95° C	15 seg
	55° C	30 seg
	72° C	3 min
1 ciclo	72° C	5 min

Corte con las enzimas NruI y XhoI

Se tomó 1 μ g del vector pT7CF1-CHis y se cortó simultáneamente con las enzimas *NruI* y *XhoI* (Thermo Fisher Scientific) por 1 h a 37°C, utilizando el buffer Cutsmart (NEB) y H₂O. Para el inserto se tomaron 500 ng y se cortó con las mismas condiciones para el corte del vector. Tanto el vector como el inserto se purificaron de gel, por columna (GeneJet Gel Extraction Kit, Thermo scientific).

Ligación

Se realizó la mezcla de ligación (proporción 1:5 pT7CF1-CHis:ORF2, 1 μ l T4 DNA ligasa 5 U/ μ l (Thermo Fisher Scientific), 3 μ l buffer T4 DNA ligasa 10x y H₂O libre de nucleasas) y se dejó ligando toda la noche a 16° C. Finalmente se purificó por columna (GeneJet PCR Purification Kit, Thermo scientific).

Transformación de bacterias DH5 α electrocompetentes

Una vez purificada la ligación se tomó un volumen de 5 μ l y se agregó en condiciones de esterilidad a 50 μ l de bacterias DH5 α (DO 0.25) en hielo. A continuación, se electroporaron las bacterias bajo las siguientes condiciones: 10 μ F, 600 Ohm y 1800 Volts durante 2 s. Los 35 μ l se colocaron en 500 μ l de medio LB

(Luria Bertani) y se incubaron durante 1 h a 37°C. El volumen final se plaqueó en cajas Petri con medio LB y 100 µg/ml de Cb (carbenicilina).

PCR de colonia

Para el PCR de colonia se preparó una mezcla de reacción (2 µl dNTPs 12.5 mM, 2 µl oligonucleótido sentido (10 pmol/µl), 2 µl oligonucleótido anti-sentido (10 pmol/µl), 10 µl Thermo pol buffer, 0.5 µl Taq DNA pol y H₂O libre de nucleasas). De esta mezcla se tomaron 10 µl para cada tubo. En condiciones de esterilidad se picó una colonia utilizando una punta blanca de pipeta Eppendorf y se introdujo dicha punta en los tubos con la mezcla de PCR e inmediatamente después se depositó la misma punta en un tubo Eppendorf con 200 µl de medio LB más el antibiótico de selección. Las bacterias depositadas en los tubos con la punta se incubaron a 37°C en agitación y el DNA en los tubos se amplificó por PCR.

IX. Transfección de los plásmidos pT7-ORF2 VA1 en HEK 293T T7

Se crecieron células HEK 293T T7 en una placa de 48 pozos hasta una confluencia del 80%. Una hora antes de iniciar la transfección se les cambió el medio por 225 µl de DMEM Adv fresco. Se preparó la mezcla de DNA agregando MEM sin suero para 12.5 µl finales, 2 µl agente P3000 (ThermoFisher) por cada µg de DNA transfectado y la cantidad del DNA de interés a transfectar (entre 1 y 2µg); a la par se preparó la mezcla de lipofectamina agregando 12.5 µl de MEM sin suero finales y 2µl lipofectamina 3000 (ThermoFisher) por cada µg de DNA transfectado. La mezcla de DNA se añadió a la mezcla de lipofectamina y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se añadió a la monocapa de células por goteo y se incubó durante 48 h a 37°C. Transcurrido el tiempo se quitó el sobrenadante y las células se recuperaron en 70 µl de buffer Laemmli, se hirvió durante 5 min y se realizó un Western blot utilizando los anticuerpos que se indican.

X. Optimización del ORF1a para su clonación en el vector pT7CF1-CHis

Debido a los antecedentes de la dificultad de clonar el ORF1a, aparentemente debido a su secuencia de nucleótidos se decidió optimizar la secuencia del ORF1a para humano utilizando la herramienta <https://www.idtdna.com/CodonOpt>. Esta secuencia optimizada se sintetizó y clonó en la compañía GenScript para, de manera posterior, transfectar junto con el pT7-ORF2 en las células HEK 293T T7 y evaluar el procesamiento por Western blot.

VII. RESULTADOS

I. Caracterización del procesamiento de la proteína precursora de la cápside del astrovirus VA1.

Para avanzar en la caracterización del procesamiento proteolítico de la proteína precursora, y definir con mayor certeza su peso molecular, se usaron anticuerpos policlonales dirigidos contra dos fragmentos de la poliproteína que fueron generados previamente (41) (Fig. 9B, sueros DB y α -core). El suero de conejo DB reconoce la proteína del *core* y una región del amino terminal de la espícula, mientras que los anticuerpos α -core reconocen un fragmento específico de este dominio de la proteína. Para contar con herramientas inmunológicas más específicas que permitieran caracterizar con mayor precisión el procesamiento de la proteína precursora de la cápside, se sintetizaron dos péptidos en la compañía GeneScript que corresponden a la espícula (α -espícula) y al carboxilo terminal (α -COOH) de la proteína precursora (Fig. 9B), de acuerdo a lo que se sabe de estos dominios en la proteína VP90 de los astrovirus clásicos (Fig. 9A).

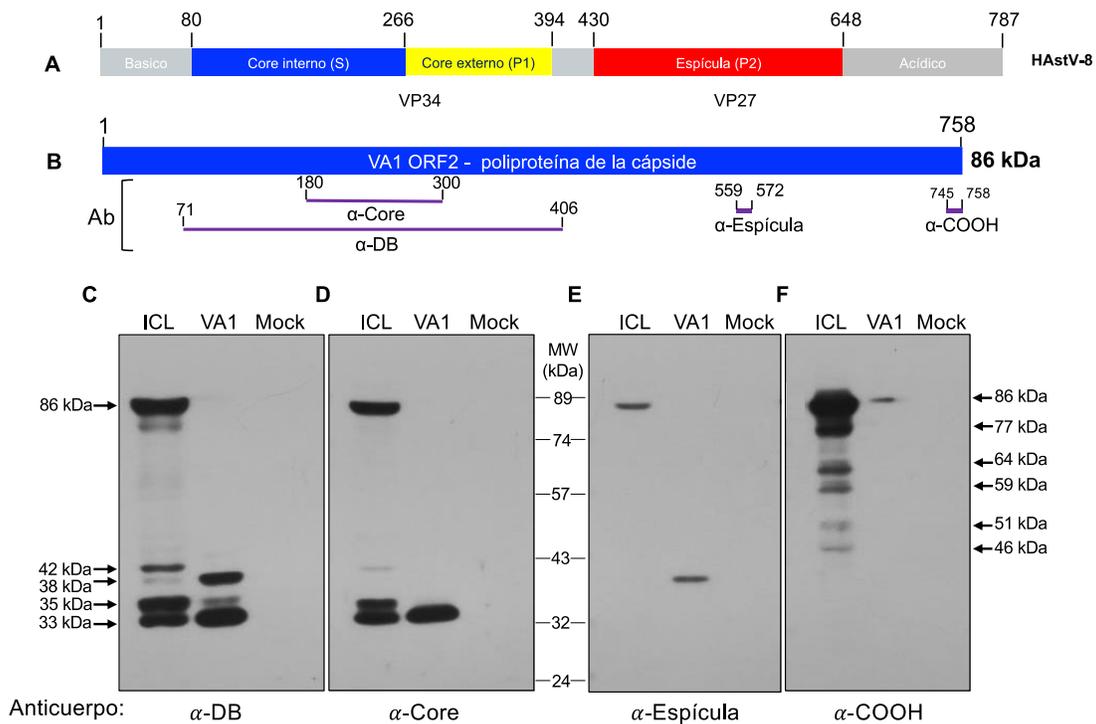


Figura 9. Caracterización de los productos del procesamiento de la proteína de la cápside. (A) Diagrama del precursor de la cápside y su procesamiento en el astrovirus clásico HAstV-8, (B) Diagrama del precursor de la cápside y proteínas y péptidos recombinantes. El ORF2 se representa como un recuadro; las proteínas recombinantes y los péptidos α -Espícula y α -COOH utilizados para generar anticuerpos se representan como líneas moradas. El diagrama está a escala, y se muestran las posiciones relativas de las proteínas recombinantes Core y DB del astrovirus VA1, y los péptidos espícula y COOH; los números indican los residuos de aminoácidos VA1 ORF2 incluidos en cada proteína o péptido. (C-F) Identificación de las proteínas de la cápside, core y espículas ensambladas en el virus infeccioso maduro. Las monocapas de células Caco-2 no se infectaron (Mock) o se infectaron con VA1 a una MOI de 5 y se dejó que la infección prosiguiera durante 48 horas a 37°C. Al final del período de incubación, se descartó el medio celular y la monocapa se lavó dos veces con DMEM-HG y se lisó mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Se añadió buffer Laemmli y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 10% y se analizaron mediante Western blot utilizando los anticuerpos (C) α -DB, (D) α -core, (E) α -Espícula o (F) α -COOH. ICL, lisado celular infectado; VA1, partículas virales purificadas; Mock, células no infectadas. Los marcados de peso molecular (MW) están indicados entre los paneles (D) y (E). Las flechas en el panel izquierdo (C) y en el panel derecho (F) indican los pesos moleculares estimados aparentes para las proteínas virales. Las proteínas de 33 y 38 kDa corresponden al core y la espícula del virus maduro e infeccioso.

Los diversos anticuerpos se usaron para analizar mediante Western blot las proteínas de células Caco-2 infectadas y cosechadas a 48 h post-infección, células no infectadas (*mock*) y las proteínas presentes en el virus purificado (Fig. 9C-F). En el lisado de células infectadas, el anticuerpo DB reconoció una proteína precursora principal de 86 kDa y un segundo precursor menor de aproximadamente 80 kDa. También se reconocieron cuatro proteínas adicionales, de 33, 35, 38 y 42 kDa (Fig. 9C). En el virus purificado se detectaron dos proteínas principales, de 33 y 38 kDa, lo que confirma que el anticuerpo DB reconoce regiones del *core* y de la espícula del virus; también se observó débilmente una tercera proteína de 35 kDa (Fig. 9C). El anticuerpo policlonal que se esperaba que reconociera el dominio *core* (α -*core*) reconoció la proteína precursora de 86 kDa y tres proteínas de 33, 35 y 42 kDa en el lisado de células infectadas, mientras que en el virus purificado una sola proteína de 33 kDa (Fig. 9D). Estos resultados indican que la banda de 33 kDa corresponde al *core* del virus, mientras que las proteínas de 35 y 42 kDa parecen ser intermediarios de procesamiento de este dominio estructural. En diferentes experimentos la proteína precursora de 35 kDa mostró un peso molecular aparente que osciló entre 34.5 y 36.2 kDa, mientras que la de 42 kDa osciló entre 40.5 y 42.6 kDa, lo que sugiere que sitios de procesamiento alternativos pueden dar lugar a proteínas intermediarias del *core* que se pueden ensamblar en las partículas virales maduras (infecciosas).

El anticuerpo dirigido contra la espícula (α -espícula) sólo reconoció la proteína precursora de 86 kDa en el lisado celular infectado, y una proteína de 38 kDa en el virus purificado (Fig. 9E), lo que indica que esta proteína corresponde a la espícula. La no detección de la proteína de 38 kDa en las células infectadas probablemente se debe a la baja afinidad, o bajo título, de los anticuerpos α -espícula. Finalmente, el anticuerpo dirigido contra la región carboxilo terminal de la poliproteína codificada por ORF2 (α -COOH) reconoció la proteína precursora, así como productos de procesamiento intermedio en el lisado celular de varios pesos moleculares. También reconoció trazas del mismo precursor en el virus purificado

(Fig. 9F), lo que sugiere que la proteína precursora no está presente en el virus maduro o está en muy pequeña cantidad. De manera importante, estos resultados indican que la región COOH-terminal de la proteína precursora se corta durante el procesamiento de la poliproteína y no está presente en el virus maduro. No se observaron bandas en lisados de células no infectadas con ninguno de los cuatro anticuerpos de proteína α -ORF2 evaluados.

Después del análisis de más de diez inmunoblots, y con base en las masas moleculares observadas para la proteína precursora y para las proteínas incorporadas en el virus infeccioso, nombramos VP86, VP38 y VP33 a la proteína precursora, la proteína de la espícula y la proteína del *core*, respectivamente.

Este análisis nos permitió además definir con mayor certeza los posibles sitios de procesamiento de la proteína precursora que dan origen a los intermediarios de corte, así como a las proteínas que están presentes en los viriones infecciosos (Fig. 10).

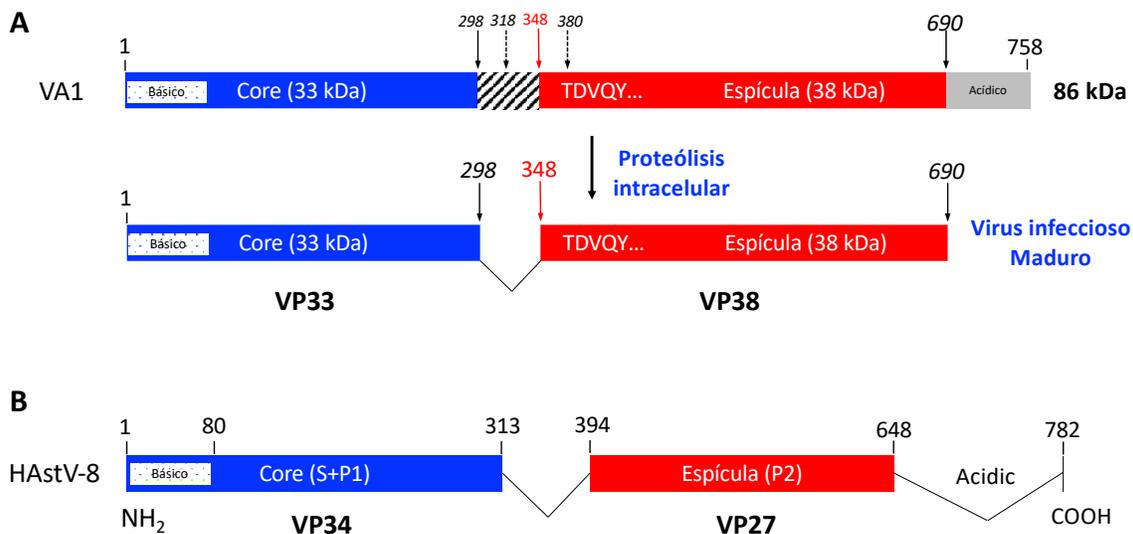


Figura 10. Procesamiento proteolítico propuesto para la proteína de la cápside ORF2 del astrovirus VA1. (A) Los cuadros azul y rojo representan los productos proteolíticos observados durante la replicación del virus; el recuadro rayado representa un péptido conector que probablemente se pierde durante el proceso de maduración del precursor. Se indican los dominios básicos y ácidos del precursor. La flecha roja indica el extremo amino del dominio de la espícula VP38 determinado por la secuenciación N-terminal de la proteína; las flechas negras continuas representan el extremo carboxilo estimado de VP33 y VP38, basado en los pesos moleculares aparentes de las proteínas que constituyen el virus infeccioso maduro; las flechas discontinuas representan procesamientos que dan productos proteolíticos intermedios del core de VP36 y VP42. (B) Productos del procesamiento por tripsina que constituyen el virus clásico maduro e infeccioso del astrovirus serotipo 8 de humano (HAstV-8).

II. Caracterización de las proteínas que forman el virión maduro

Para complementar la caracterización de las proteínas estructurales del virus y definir de manera más fina los extremos amino y carboxilo del core y de la espícula, se llevó a cabo un análisis por espectrometría de masas de las proteínas presentes en el virus purificado. Para esto, se purificaron las partículas virales por gradientes de densidad en CsCl y se separaron las proteínas por electroforesis en un gel de poliacrilamida/SDS. Las bandas se tiñeron con azul de Coomassie, se cortaron del gel y se analizaron por espectrometría de masas.

Para definir con mayor precisión la secuencia de cada una de las dos proteínas, se identificaron los péptidos obtenidos por digestión trípica de las

proteínas (incluyendo en el análisis los péptidos semi-trípticos), así como los obtenidos por digestión con la proteasa ProAlanasa, que corta en prolinas y alaninas. El resumen de las secuencias determinadas para cada proteína con base en la colección de péptidos identificados se muestra en la figura 11.

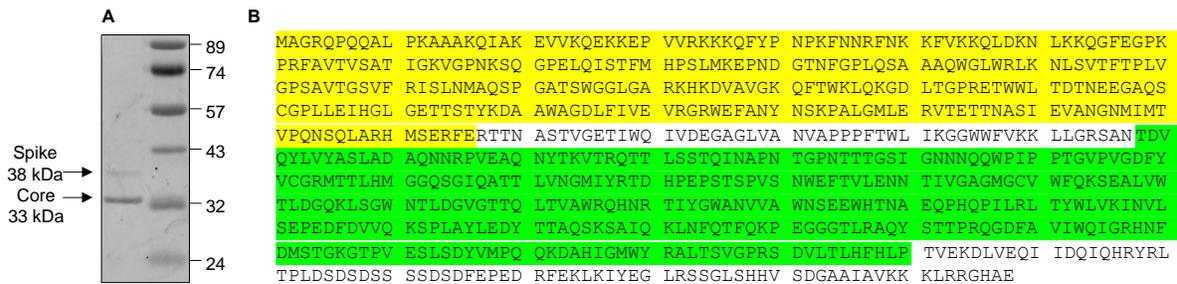


Figura 11. Secuenciación del N-terminal y análisis por espectrometría de masas de las proteínas de la cápside del virus maduro. (A) Las proteínas del virus purificado por CsCl se separaron mediante SDS-PAGE al 11 %, se tiñeron con azul de Coomassie coloidal, (B) En amarillo se encuentra la secuencia de aminoácidos correspondiente al core VP33 y en verde la espícula VP38.

Resultado en amarillo se muestra la secuencia determinada para VP33 (core) y en verde la secuencia identificada a partir de los péptidos de VP38 (espícula). Como se puede ver, existe una región entre las dos proteínas para la cual no se identificaron péptidos en el análisis, lo que sugiere que este segmento de la proteína se pierde durante el procesamiento de VP86 y no está presente en el virión. La masa molecular de la región señalada en amarillo es de 32.7 kDa, lo que concuerda con la definida a través de los análisis de Western blot, de 33 kDa. El péptido que define el extremo amino terminal de la espícula (en verde) inicia en el aminoácido 348 (TDV...), lo que concuerda con el extremos amino de esta proteína determinada previamente por degradación de Edman (TDVQYLVYASLAD....) (39). El extremo carboxilo de la espícula, definido por el péptido SDVLT LHFHLP identificado por digestión con ProAlanasa, probablemente represente el extremo carboxilo real de la proteína, considerando que la masa molecular de la secuencia en verde es de 37.1 kDa, comparada con la estimada por Western blot, de 38 kDa. A su vez, esto indica que la región río abajo del péptido mencionado corresponde al dominio

COOH de la proteína precursora que es eliminado durante su procesamiento, de manera similar a como ocurre en los astrovirus clásicos.

III. El inhibidor de proteasas ABESF disminuye el procesamiento de la proteína de la cápside y abate la infectividad del astrovirus VA1

Para evaluar si el procesamiento es necesario para activar la infectividad del virus, decidimos probar diferentes inhibidores de proteasas que abarcaran los siete grupos de proteasas que se han descrito, con base en sus residuos catalíticos (mixtas, serín, treonín, cisteín, aspartil, glutamil y metaloproteasas). Para esto, se infectaron células Caco-2 durante 24 h con astrovirus VA1 a una MOI de 5, tiempo al cual se detecta ya a la proteína precursora, aunque su procesamiento es todavía limitado (ver Fig. 12). A este tiempo se adicionaron los inhibidores y se incubaron por 12 horas. Transcurridas las 36 horas se lavaron las células, se agregó un inhibidor de proteasas general (complete ultra) para evitar que continuara el procesamiento de las proteínas o su degradación durante los pasos siguientes y se colectaron las células para evaluar el procesamiento y la infectividad en presencia de los diferentes inhibidores (Fig. 12).

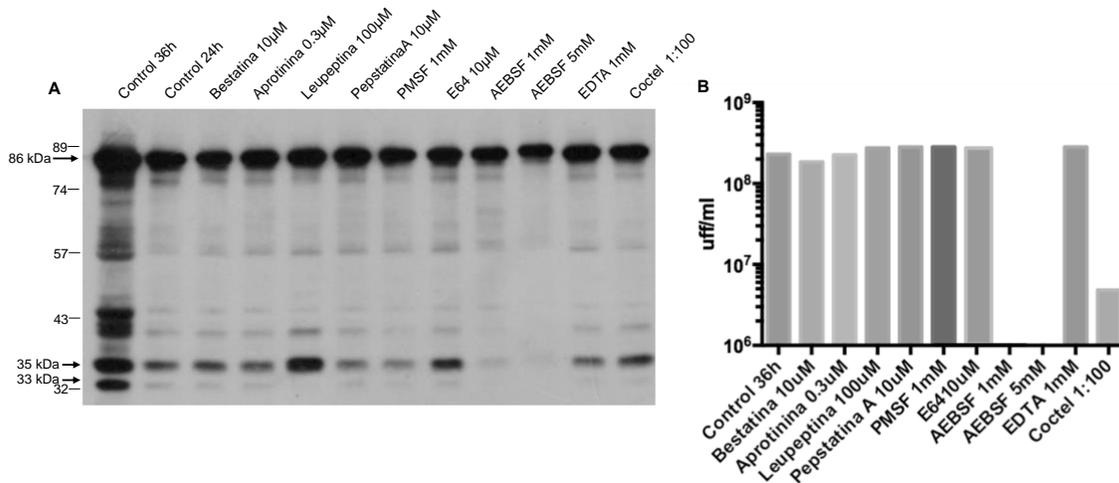


Figura 12. Efecto de varios inhibidores de proteasas en el procesamiento de las proteínas de la cápside y en el título infeccioso. (A) Western blot utilizando el anticuerpo DB, se observa la proteína precursora de 86 kDa y algunos intermediarios del procesamiento. Hay un menor procesamiento con el inhibidor AEBSF. (B) Título infeccioso del astrovirus VA1. Hay una disminución en el título al agregar el coctel de inhibidores de proteasas y no hay título en presencia del inhibidor AEBSF.

Como se puede ver en la figura 12, en presencia de todos los inhibidores utilizados se observó un nivel de procesamiento similar de la proteína precursora comparado con la condición control a 24 horas. La excepción a esto fue el inhibidor AEBSF, que fue el único que demostró disminuirlo (Fig. 12A), ya que en las dos concentraciones evaluadas VP86 no se procesa en proteínas de menor peso, como VP33 y VP38. De manera interesante, AEBSF fue también el único que disminuyó la producción de virus infeccioso (Fig. 12B). El inhibidor AEBSF (clorhidrato de fluoruro de 4-bencenosulfonilo) se une irreversiblemente a las serín proteasas. A pesar de que se probaron otros inhibidores de serín proteasas, como aprotinina, leupeptina y PMSF, no se observó un efecto con estos.

Una de las posibilidades que surgieron al observar el efecto en la disminución de la infectividad utilizando el inhibidor AEBSF, es que este podría actuar inhibiendo a la propia proteasa de serina del virus o la síntesis *de novo* de proteínas. Esto último se descartó al utilizar el antibiótico cicloheximida, el cual bloquea la

elongación traduccional, al observar que no es necesaria la síntesis *de novo* para que ocurra el procesamiento de la proteína precursora, es decir, AEBSF inhibe el procesamiento parcial de VP86 de manera independiente a la síntesis de proteínas virales (resultados no mostrados).

IV. ¿La proteasa involucrada en el procesamiento de la proteína precursora de la cápside del ORF2 del astrovirus VA1 es de origen celular o viral?

Para contestar esta pregunta se exploraron las siguientes estrategias:

1. Expresión del ORF2 de VA1 en células HEK 293T T7.

El plásmido pT7-ORF2 se utilizó para transfectar células HEK 293T T7 (44), las cuales expresan constitutivamente la polimerasa del fago T7. Esto permite la transcripción del ORF2 de VA1 en el citoplasma bajo el promotor T7 y, por ende, la producción de la proteína de la cápside VP86 codificada por este ORF2. La producción de la proteína y su procesamiento se evaluaron por medio de Western blot utilizando el anticuerpo DB.

El anticuerpo DB reconoce a la proteína precursora de la cápside de 86 kDa, sin embargo, esta no se encuentra procesada, ya que no se observa el *core*, la espícula y sus intermediarios. Para corroborar que el ORF2 no se está procesando en las células HEK 293T T7, se repitió el experimento agregando como control células Caco-2 y HEK 293T T7 infectadas con VA1 (Fig. 13).

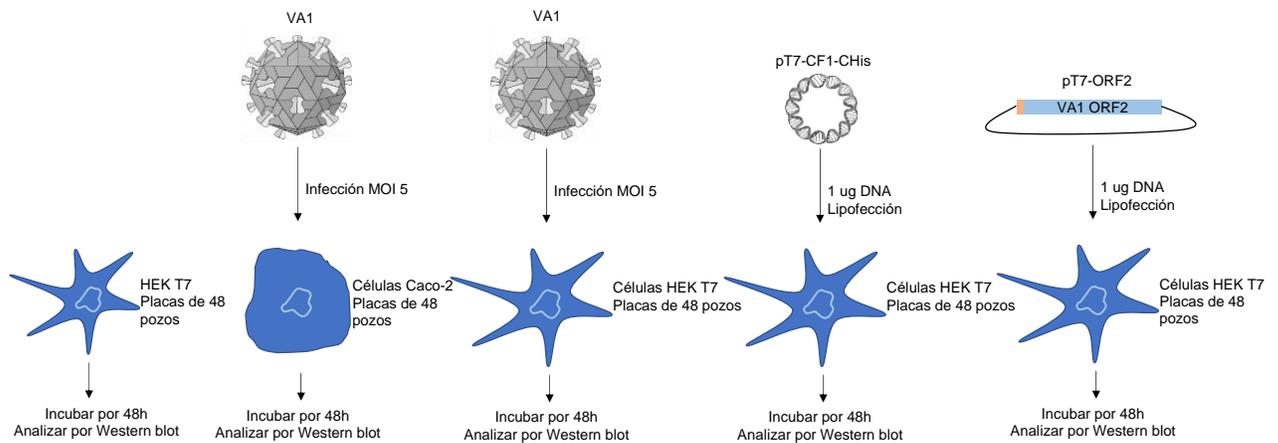


Figura 13. Metodología experimental para la transfección de la clona pT7-ORF2 VA1.

Al evaluar la susceptibilidad de las células Caco-2 y HEK 293T T7 a la infección por VA1 encontramos que estas últimas se infectan 20 veces menos. Por esta razón, evaluamos el procesamiento de VP86 en HEK 293T para poder interpretar mejor el resultado anterior en el que la proteína precursora de 86 kDa se expresa, pero no se procesa. Para esto, se infectaron las células HEK con VA1 a una MOI de 5 durante 48 h, y se detectó la síntesis y el procesamiento de la proteína precursora y de sus productos de procesamiento. Aunque en ambas líneas celulares se detectó la proteína y sus productos proteolíticos, el procesamiento de VP86 en células HEK es menos eficiente que en células Caco-2 infectadas en las mismas condiciones.

La observación de que la proteína VP86 no se procesa cuando se sintetiza a partir del plásmido, en ausencia del contexto de la infección viral, sugiere que la proteasa podría ser de origen viral, o bien, que el procesamiento de la VP86 por una proteasa celular requiere del contexto general que se genera en células infectadas, como es la remodelación de las membranas intracelulares inducida durante la replicación del virus (25, 26).

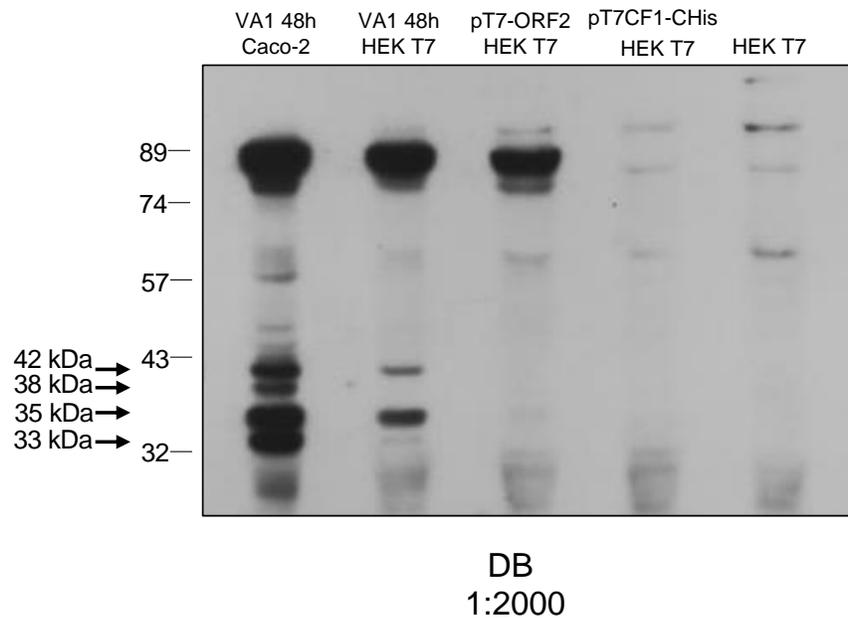


Figura 14. Western blot de células Caco-2 o HEK 293 T7 infectadas con VA1 y HEK 293 T7 transfectadas con pT7-ORF2 o con el vector vacío pT7CF1-CHis. Se muestra el Western blot de las muestras utilizando el anticuerpo DB. Se señala con flechas al core 33 kDa, la espícula 38 kDa y los intermediarios del core de 35 y 42 kDa.

Considerando que no se observó el procesamiento de la proteína VP86 expresada a partir del plásmido pT7-ORF2, a pesar de expresarse de manera clara, decidimos evaluar la siguiente estrategia:

2. Co-expresión en células HEK293T T7 del ORF2 de VA1 con la región del ORF1a, que codifica a la proteasa viral.

Para evaluar si el procesamiento de la proteína precursora podía ocurrir en presencia de la proteasa viral expresada también a partir de un plásmido, se clonó el ORF1a de VA1 en el plásmido pT7CF1-CHis. Se evaluaron diferentes estrategias de clonación del ORF1a sin éxito, por lo que se optó por utilizar los servicios de clonación en la compañía GeneScript. Esta compañía tampoco tuvo éxito después de probar la clonación del gen en varios plásmidos, condiciones de temperatura de crecimiento y cepas de *E. coli*, ya que las clonas obtenidas tuvieron deleciones o mutaciones. Considerando que el problema de clonación podía deberse a la

toxicidad para las bacterias de la secuencia de DNA del segmento de interés, se diseñó una región del ORF1a optimizada para codones de células humanas y nuevamente se intentó su síntesis y clonación en la compañía GeneScript. Esta versión de ORF1a tuvo 689 nt de diferencia con la secuencia original, de 2661 nt totales.

El ORF1a optimizado para codones humanos sí se pudo clonar, por lo que pudimos co-expresarlo en células HEK-T7 junto con el ORF2, ambos clonados en el plásmido pT7CF1-CHis. Para esto, transfectamos 1 μ g del plásmido de ORF2 junto con 500 ng, 1 μ g y 2 μ g del plásmido de ORF1a, respectivamente, en células HEK-T7 por 48 h. A continuación, analizamos por Western blot el procesamiento de la proteína VP86 utilizando el anticuerpo DB. También utilizamos el anticuerpo α -proteasa NH₂ para evaluar la síntesis de esta proteína a partir del plásmido ORF1a (Fig. 15).

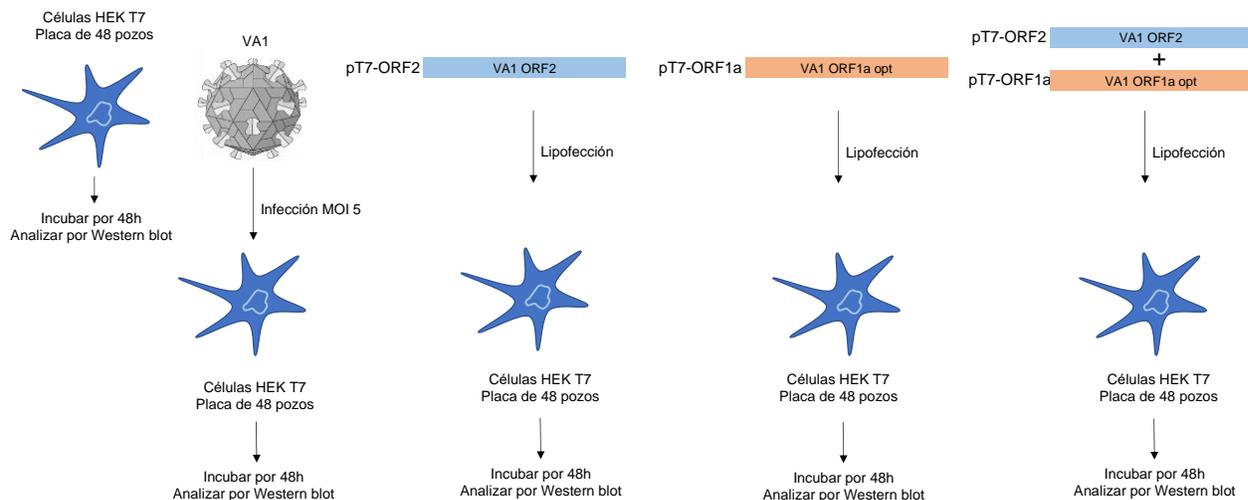


Figura 15. Metodología experimental para la co-transfección de la clona pT7-ORF2 VA1 y clona pT7-ORF1a optimizado en HEK 293T T7.

Al transfectar las células HEK 293T T7 con la clona pT7-ORF1a y ORF2, por separado, es posible identificar la producción de la proteína precursora VP86 y la proteasa de alrededor de 21 kDa, lo que sugiere que la transfección ocurrió y las proteínas se están expresando dentro de la célula. A pesar de que el ORF2 se está expresando abundantemente, no es posible apreciar el procesamiento de VP86 incluso a diferentes concentraciones del plásmido de ORF1a (Fig. 16). Estos resultados confirman el no procesamiento de VP86 cuando se sintetiza a partir de un plásmido, aun en presencia de la expresión de la proteasa viral, cuando esta se sintetiza también a partir de un plásmido.

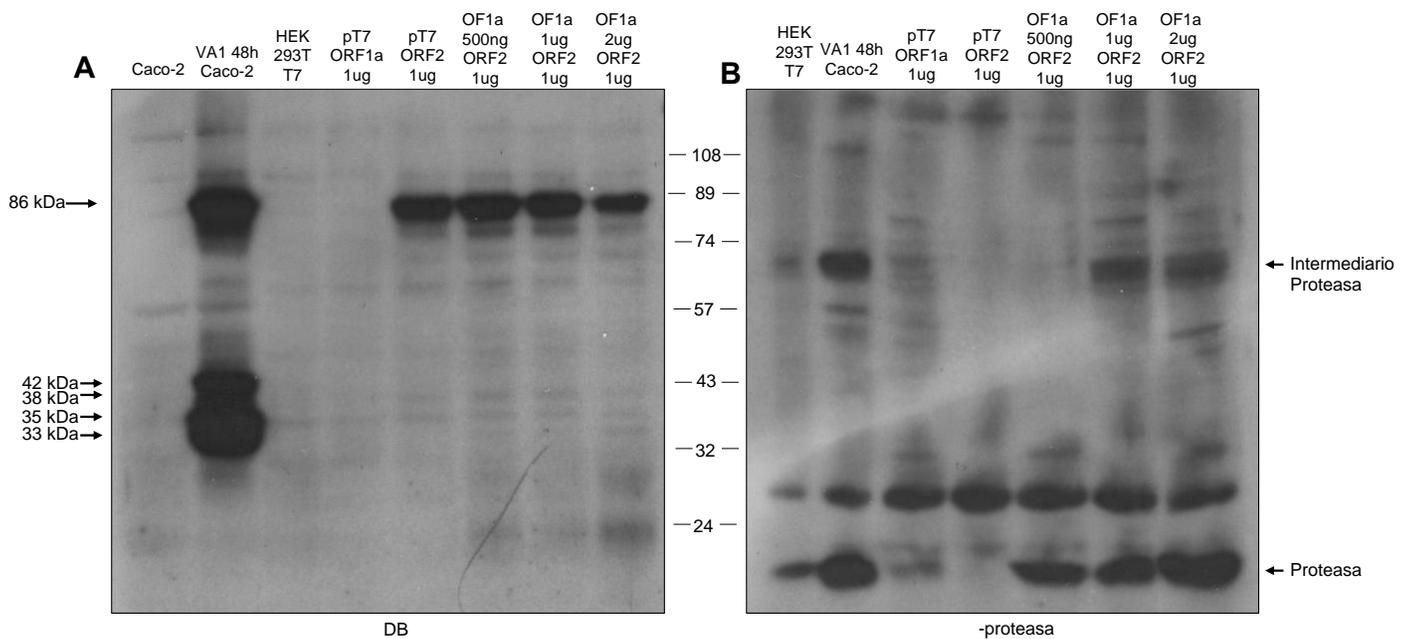


Figura 16. Western blot de la co-transfección del ORF1a optimizado junto con el ORF2 del astrovirus VA1 en la línea celular HEK 293T T7. (A) Western blot utilizando el anticuerpo DB, se observa la proteína precursora de 86 kDa en el control y en los carriles donde se transfectó el ORF2 y el control de células infectadas, (B) Western blot utilizando el anticuerpo α -proteasa NH3, se observa la proteasa en alrededor de 21 kDa en los carriles donde se transfectó el ORF1a y el control de células infectadas.

VIII. DISCUSIÓN

Utilizando anticuerpos dirigidos contra las diferentes regiones codificadas por el ORF2, encontramos que los virus maduros están compuestos por dos proteínas, una de 33 kDa (VP33), que representa el dominio del *core* del virus, y una segunda proteína de 38 kDa (VP38) que constituye el dominio de la espícula viral. Además, detectamos varios intermediarios de corte de la poliproteína del ORF2 durante la ruta proteolítica que origina a VP33 y VP38. Los productos intermediarios detectados variaron en diferentes experimentos y también con el anticuerpo utilizado. Por ejemplo, cuando se utilizó el anticuerpo dirigido contra el extremo carboxilo de la proteína precursora, además de la proteína precursora de 86 kDa (VP86), se observaron bandas de 46 a 77 kDa. Esto indica que el ORF2 se procesa por el corte del extremo amino terminal para originar al menos 5 productos intermediarios. Por otro lado, cuando se utiliza el anticuerpo contra el *core*, el procesamiento de VP86 también puede comenzar desde la región carboxilo terminal, ya que se observan productos de 35 y 42 kDa. Los resultados sugieren que existen rutas de procesamiento alternativas que finalmente convergen para producir a VP33 y VP38, los dos polipéptidos que constituyen a la forma madura infecciosa del virus. El intermediario del *core* de 35 kDa se observó muy a menudo en muestras de lisados celulares infectados a pesar de que no se detectó en el virus maduro. El peso molecular esperado de la proteína precursora, basándonos en la composición de 758 aminoácidos es de 84.2 kDa. Sin embargo, el peso molecular aparente observado es de 86 kDa. No es claro si es por una migración atípica de la proteína durante la electroforesis o modificaciones post-traduccionales de la proteína en cápside.

Considerando el peso molecular de VP33 (*core*) y el extremo amino terminal de la espícula, parece ser que se pierde un segmento de alrededor de 50 aminoácidos de la proteína precursora durante su procesamiento, al igual que se ha observado en el procesamiento de VP70 en HAsV-8 (1, 37). Nuestros resultados, junto con la reciente determinación de la estructura cristalográfica de la proteína de

espícula por el grupo de la Dra. Rebecca DuBois, de la Universidad de California en Santa Cruz, sugieren que el extremo amino terminal de la proteína de la espícula contiene una o más hebras beta entre los residuos 350-385 que lo unen a la proteína del *core* (comunicación personal). Este comportamiento también se ha observado en la región amino terminal de la espícula de los astrovirus clásicos de humano (45). Interesantemente, encontramos que la espícula del astrovirus VA1 es más grande que la proteína del *core*, opuesto a lo observado en los astrovirus clásicos de humanos (22). La reciente resolución de la estructura por rayos-X de la proteína espícula de VA1, junto con el modelamiento del dominio del *core* de VA1 (comunicación personal) basado en la estructura cristalográfica de este dominio determinado previamente para dos serotipos de astrovirus clásicos (19–21), en conjunto con los esfuerzos de nuestro grupo en colaboración con la Dra. Jane Tao de la Universidad de Rice por determinar la estructura de la partícula viral por criomicroscopía electrónica permitirá explorar las bases estructurales del procesamiento intracelular por una proteasa todavía no identificada.

Para confirmar que el procesamiento es importante para activar la infectividad viral decidimos evaluar diferentes inhibidores de proteasas durante la infección de células con VA1. El inhibidor AEBSF fue el único que demostró una disminución en el procesamiento de VP86 y el abatimiento de la infectividad. AEBSF es un inhibidor permeable e irreversible de serín proteasas que actúan al reaccionar con el hidroxilo del residuo de serina en el sitio activo para formar derivados de sulfonilo. Ninguno de los otros inhibidores de serín proteasas, como aprotinina, leupeptina y PMSF, fueron capaces de producir una disminución similar en la infectividad viral y en el procesamiento de VP86. El inhibidor aprotinina es reversible, sin embargo, no es permeable a las células. Por otro lado, el inhibidor leupeptina es reversible y se ha reportado como permeable y no permeable. Finalmente, el inhibidor PMSF es irreversible y se ha reportado como permeable y no permeable (ver Tabla 2). Además, se probaron inhibidores de otras familias como

cisteína, aspártico y metaloproteasas sin mostrar efectos sobre el procesamiento y la infectividad viral.

Se ha observado que el inhibidor AEBSF es capaz de disminuir la infectividad de otros virus de RNA como dengue y el virus sincicial respiratorio (RSV) (46, 47), a través de inhibir la síntesis de colesterol o inhibir la entrada del virus, respectivamente. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo siguieron que AEBSF inhibe el procesamiento parcial de VP86 a sus formas procesadas y, por ende, no hay infectividad, confirmando que el procesamiento a la partícula madura de VP33 y VP38 es necesario para activar la infectividad.

Para evaluar si la proteasa encargada del corte proteolítico de la proteína de la cápside es de origen viral o celular, expresamos el ORF2 de VA1 en células HEK-T7, no infectadas con el virus. Encontramos que la proteína precursora de la cápside VP86 se expresa eficientemente, sin embargo, esta no se procesó, sugiriendo que el procesamiento es dependiente de la proteasa viral. Para explorar esta posibilidad, decidimos proveer la proteasa viral co-expresándola en las células junto con el ORF2. Para esto, clonamos el ORF1a de VA1, el cual codifica a las proteínas no estructurales del virus, incluyendo la proteasa. Células HEK-T7 fueron co-transfectadas con los vectores que dirige la síntesis de ORF2 y el del ORF1a. Ensayos de Western blot revelaron que VP86 y la proteasa se co-expresaron en la línea células, sin embargo, no se observó el procesamiento VP86. Estos hallazgos pueden tener varias posibilidades. La primera es que la proteasa que procesa VP86 sea realmente la de origen viral, pero que no se haya expresado en la cantidad suficiente, o está no se encuentra en el compartimento celular adecuado para interaccionar y procesar a la proteína. La segunda posibilidad es que se requiera el contexto de la infección de VA1 para generar las condiciones intracelulares necesarias para el procesamiento. Por ejemplo, la interacción de VP86, de la proteasa viral, o bien de ambas, con el sistema membranosos de la célula que se genera como consecuencia de la replicación de VA1. Este comportamiento se ha

reportado para astrovirus clásicos y muchos otros virus de RNA de una sola cadena de polaridad positiva, como poliovirus, norovirus, dengue, hepatitis C, coronavirus, entre otros (48, 49). La tercera posibilidad es que la proteasa encargada de procesar a VP86 de VA1 sea de origen celular y que su expresión/activación sea inducida durante el proceso de infección. Es también posible que el contexto de la infección sea necesario para reclutar la o las proteasas celulares involucradas en el procesamiento a los compartimentos adecuados de la célula.

Es interesante mencionar que la clonación del ORF1a de VA1 representó un obstáculo importante, ya que ni con el esfuerzo realizado en el laboratorio, o el de la compañía GeneScript, logramos su clonación. En todas las ocasiones se generaron mutaciones o deleciones en los primeros 1600 nucleótidos del ORF1a. Datos similares fueron reportados previamente por el grupo del Dr. Wang, cuando estableció un sistema de genética reversa para VA1 (50). El análisis de las características de la secuencia de DNA del ORF1a mostró que los primeros 1600 nucleótidos del genoma de VA1 tienen un porcentaje alto de adeninas y timinas (60%). Las regiones ricas en A-T han sido reportadas como sitios en los que se forman los complejos de replicación y donde se inicia la síntesis de DNA (51), y se ha visto que son zonas propensas a generar inserciones o mutaciones, por esta razón decidimos optimizar el uso de codones del ORF1a para humano cambiando 689 nt (52% A-T), lo cual fue suficiente para permitir la clonación del ORF1a.

Nuestros resultados no nos permitieron concluir si la proteasa involucrada en el procesamiento de VP86 es de origen celular o viral, aunque también es posible la participación de más de una proteasa. Se tienen consideradas varias estrategias para tratar de determinar el origen de la proteasa, así como su identidad. Para esto, se propone a futuro: 1) Evaluar si el contexto de la infección es importante para el corte proteolítico de VP86, construyendo un vector que exprese un tag (cola de histidinas, myc, flag, etc.) fusionado al extremo amino de ORF2 y expresar esta proteína de fusión en células que haya sido concomitantemente infectadas. Esto se

puede hacer con el mismo sistema de HEK-T7, o construyendo un nuevo vector que exprese la proteína ORF2 a partir de un promotor de células de mamífero y evaluar el sistema en células Caco-2. 2) Co-traducir el mRNA del ORF1a y el ORF2 de VA1, ya sea a partir de transcritos generados *in vitro*, o bien a partir de los plásmidos en un sistema *in vitro* acoplado transcripción-traducción (e.g., reticulocitos de conejo), el cual permita evaluar si la proteasa viral procesa a VP86 en estas condiciones. Una variante de esta estrategia es co-traducir el genoma viral y el mRNA del ORF2 *in vitro*, teniendo al genoma del virus como la fuente de la proteasa viral. 3) Incubar un lisado de células HEK-T7 o Caco-2, infectadas y no infectadas, con la proteína ORF2 sintetizada *in vitro* y evaluar el procesamiento de VP86. Actualmente, todas estas estrategias alternativas las estamos llevando a cabo en el laboratorio. Enfoques más sofisticados que podrían llevarse a cabo en el futuro son: i) evaluar el transcriptoma de células Caco-2 infectadas y no infectadas para detectar la posible inducción de la expresión de proteasas celulares; y ii) determinar el interactoma de la proteína VP86 y o de la espícula en células infectadas. Estas dos últimas estrategias darían información mucho más amplia acerca de la biología del virus y de su interacción con la célula, que es un objetivo general de interés para nuestro grupo.

Existe la posibilidad de que la proteasa sea de origen viral, ya que se ha reportado que para virus de la familia *Picornaviridae* (los cuales tienen un genoma ssRNA(+), como poliovirus, hepatitis A, coxsackievirus y calicivirus felino) hay evidencia que la propia proteasa viral está involucrada en algún corte de las proteínas estructurales y están encargadas del procesamiento de las proteínas no estructurales (52–54). Esto también ocurre en algunos virus de la familia *Flaviviridae*, como fiebre amarilla, dengue o Zika (55). Sin embargo, en otras familias de virus de ssRNA(+), como *Togaviridae*, no hay evidencia de procesamiento de las proteínas estructurales por parte de la proteasa viral. Tampoco en el caso de virus de la familia *Coronaviridae*, ya que las proteínas estructurales del virus se expresan a partir de RNA mensajeros individuales (56).

Finalmente, es importante mencionar que el astrovirus VA1 infecta y se replica en células neurales (40, 57) y se le ha asociado con encefalitis en individuos inmunodeprimidos. Lo anterior es consistente con la independencia de la infectividad de VA1 a ser activada por tripsina y con la participación de una proteasa intracelular o viral en el proceso. Los resultados obtenidos en esta tesis sientan las bases para profundizar en el estudio de la biología del astrovirus VA1, incluyendo el papel que juega el procesamiento de la poliproteína precursora en el ciclo replicación. Este conocimiento será relevante para el eventual diseño de medidas de control para la infección causada por este virus, en particular para el tratamiento de los casos de encefalitis que, hasta ahora, han mostrado alta mortalidad.

IX. CONCLUSIONES

- El procesamiento proteolítico de la proteína precursora de la cápside que activa la infectividad del virus depende de la proteasa viral o de una proteasa celular, o de ambas, pero no del corte por tripsina, como ocurre con los astrovirus clásicos.
- La proteína precursora de la cápside del astrovirus VA1 tiene un peso de 86 kDa (VP86) y se procesa proteolíticamente en proteínas de 33, 36, 38 y 42 kDa.
- El virus infeccioso maduro está formado por dos proteínas. La proteína de 33 kDa (VP33) que representa el *core* de la partícula, y por la proteína de 38 kDa (VP38) que constituye la espícula del virión.
- Las proteínas estructurales de VA1 presentan diferencias en relación a los astrovirus clásicos, ya que éstos están formados por un *core* de 34 kDa y la espícula de 27 kDa. Aun así, el procesamiento de ambas proteínas precursoras, de astrovirus clásicos y de VA1, pierden una región que conecta a ambos dominios de los virus.
- El fármaco AEBSF inhibe el corte de la proteína precursora a sus formas menores, lo que parece estar asociado con la pérdida de la infectividad viral.
- VP86 se sintetiza abundantemente en células HEK-T7 a partir de un vector de expresión, fuera del contexto de la infección viral. Sin embargo, la proteína precursora no se procesa proteolíticamente en estas condiciones. Tampoco se pudo observar procesamiento de VP86 cuando se co-expresó con el ORF1a del virus, como fuente de la proteasa viral.

X. PERSPECTIVAS

- Obtener una línea estable de Caco-2 que exprese la polimerasa T7 para expresar eficientemente al ORF2 en estas células, altamente susceptibles a la replicación del virus a partir del promotor de T7. Evaluar si los resultados en Caco-2 son similares o no a los encontrados en células HEK-T7, 20 veces menos susceptibles a la infección por VA1.
- Como método alternativo al punto anterior construir un vector que exprese eficientemente el ORF2 en células Caco-2, a partir de un promotor de células de mamíferos, como el de CMV.
- Continuar con las varias estrategias adicionales que se están llevando a cabo, mencionadas en la discusión, para tratar de determinar el origen de la proteasa y su identidad.
- Realizar el análisis transcripcional de células Caco-2 infectadas o no con VA1 y su comparación con células Caco-2 infectadas o no con un astrovirus clásico.
- Determinar el interactoma de la proteína de cápside de VA1 utilizando la estrategia de biotinilar a las proteínas que interaccionen con la proteína viral usando versiones cortas de la proteína BirA, como ultraID, fusionada a la proteína de cápside.
- Clonar el ORF1a optimizado junto con el resto del genoma para evaluar si es posible recuperar virus (genética reversa). Este sistema pudiera ser posteriormente utilizado para estudiar la actividad y especificidad de la proteasa viral.

XI. REFERENCIAS

1. Méndez E, Murillo A, Velázquez R, Burnham A, Arias CF. 2013. Replication cycle of astroviruses. *Astrovirus Research: Essential Ideas, Everyday Impacts, Future Directions*.
2. Janowski AB. 2021. Beyond the gastrointestinal tract: The emerging and diverse tissue tropisms of astroviruses. *Viruses* 13.
3. Appleton H, Higgins PG. 1975. *Viruses and Gastroenteritis in Infants*. Lancet. Elsevier.
4. Bosch A, Pintó RM, Guix S. 2014. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev*.
5. Kurtz JB, Lee TW, Craig JW, Reed SE. 1979. Astrovirus infection in volunteers. *J Med Virol*.
6. Reuter G, Pankovics P, Boros Á. 2018. Nonsuppurative (Aseptic) Meningoencephalomyelitis Associated with Neurovirulent Astrovirus Infections in Humans and Animals. *Clin Microbiol Rev* 31:e00040-18.
7. Vu DL, Bosch A, Pintó RM, Guix S. 2017. Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond. *Viruses* 9.
8. Burbelo PD, Ching KH, Esper F, Iadarola MJ, Delwart E, Lipkin WI, Kapoor A. 2011. Serological studies confirm the novel astrovirus HMOAstV-C as a highly prevalent human infectious agent. *PLoS One*.
9. Holtz LR, Bauer IK, Jiang H, Belshe R, Freiden P, Schultz-Cherry SL, Wang D. 2014. Seroepidemiology of astrovirus MLB1. *Clin Vaccine Immunol*.
10. Janowski AB, Owen MC, Dudley H, López T, Espinosa R, Elvin-Lewis M, Colichon A, Arias CF, Burbelo PD, Wang D. 2021. High Seropositivity Rate of Neutralizing Antibodies to Astrovirus VA1 in Human Populations. *mSphere* 6.
11. Koukou G, Niendorf S, Hornei B, Schlump JU, Jenke AC, Jacobsen S. 2019. Human astrovirus infection associated with encephalitis in an immunocompetent child: A case report. *J Med Case Rep* 13:1–5.
12. Ruone S, Wang D, Anderson LJ, Conrardy C, Gregoricus N, Finkbeiner SR, Vinje J, Li Y, Tong S, Virgin HW, Toney D. 2009. Identification of a Novel Astrovirus (Astrovirus VA1) Associated with an Outbreak of Acute

- Gastroenteritis. *J Virol* 83:10836–10839.
13. Jonassen CM, Jonassen T, Grinde B. 1998. A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhinovirus. *J Gen Virol* 79:715–718.
 14. Guix S, Caballero S, Bosch A, Pintó RM. 2005. Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication. *Virology* 333:124–131.
 15. Willcocks MM, Ashton N, Kurtz JB, Cubitt WD, Carter MJ. 1994. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *J Virol* 68:6057–6058.
 16. Lulla V, Firth AE. 2019. A hidden gene in astroviruses encodes a cell-permeabilizing protein involved in virus release. *bioRxiv* 661579.
 17. Brierley I, Vidakovic M. 2003. Ribosomal frameshifting in astroviruses. *Perspect Med Virol*.
 18. Cortez V, Meliopoulos VA, Karlsson EA, Hargest V, Johnson C, Schultz-Cherry S. 2017. Astrovirus Biology and Pathogenesis. *Annu Rev Virol* 4:327–348.
 19. Dryden KA, Tihova M, Nowotny N, Matsui SM, Mendez E, Yeager M. 2012. Immature and mature human astrovirus: Structure, conformational changes, and similarities to hepatitis e virus. *J Mol Biol*.
 20. Toh Y, Arias CF, Toh Y, Yeager M, Dryden KA, Méndez E, Tao YJ, Harper J. 2016. Crystal Structure of the Human Astrovirus Capsid Protein. *J Virol* 90:9008–9017.
 21. Dong J, Dong L, Méndez E, Tao Y. 2011. Crystal structure of the human astrovirus capsid spike. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:12681–12686.
 22. Arias CF, Dubois RM. 2017. The astrovirus capsid: A review. *Viruses* 9:1–13.
 23. Mendez E, Munoz-Yanez C, Arias CF, Gutierrez M, Lopez S, Sanchez-San Martin C, Espinosa R, Aguirre-Crespo G, Mendez E, Acevedo Y, Banos-Lara M d. R, Sandri-Goldin RM. 2014. Characterization of Human Astrovirus Cell Entry. *J Virol* 88:2452–2460.
 24. Jiang B, Monroe SS, Koonin E V., Stine SE, Glass RI. 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like

- ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10539–10543.
25. Mendez E, Aguirre-Crespo G, Zavala G, Arias CF. 2007. Association of the Astrovirus Structural Protein VP90 with Membranes Plays a Role in Virus Morphogenesis. *J Virol* 81:10649–10658.
 26. Guix S, Caballero S, Bosch A, Pintó RM. 2004. C-Terminal nsP1a Protein of Human Astrovirus Colocalizes with the Endoplasmic Reticulum and Viral RNA. *J Virol* 78:13627.
 27. Speroni S, Rohayem J, Nenci S, Bonivento D, Robel I, Barthel J, Luzhkov VB, Coutard B, Canard B, Mattevi A. 2009. Structural and Biochemical Analysis of Human Pathogenic Astrovirus Serine Protease at 2.0 Å Resolution. *J Mol Biol* 387:1137–1152.
 28. Fuentes C, Bosch A, Pintó RM, Guix S. 2012. Identification of Human Astrovirus Genome-Linked Protein (VPg) Essential for Virus Infectivity. *J Virol*.
 29. Lewis TL, Matsui SM. 1995. An astrovirus frameshift signal induces ribosomal frameshifting in vitro. *Arch Virol* <https://doi.org/10.1007/BF01315421>.
 30. Mendez E, Salas-Ocampo MPE, Munguia ME, Arias CF. 2003. Protein Products of the Open Reading Frames Encoding Nonstructural Proteins of Human Astrovirus Serotype 8. *J Virol*.
 31. Fuentes C, Guix S, Bosch A, Pinto RM. 2011. The C-Terminal nsP1a Protein of Human Astrovirus Is a Phosphoprotein That Interacts with the Viral Polymerase. *J Virol*.
 32. Méndez E, Murillo A, Velázquez R, Burnham A, Arias CF. 2013. Replication cycle of astroviruses. *Astrovirus Res Essent Ideas, Everyday Impacts, Futur Dir* 9781461447351:19–45.
 33. Murillo A, Vera-Estrella R, Barkla BJ, Méndez E, Arias CF. 2015. Identification of Host Cell Factors Associated with Astrovirus Replication in Caco-2 Cells. *J Virol* 89:10359–10370.
 34. Mendez E, Salas-Ocampo E, Arias CF. 2004. Caspases Mediate Processing of the Capsid Precursor and Cell Release of Human Astroviruses. *J Virol*.

35. Banos-Lara M del R, Méndez E. 2010. 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*.
36. Baez-Navarro C, Quevedo IR, López S, Arias CF, Iša P. 2022. The Association of Human Astrovirus with Extracellular Vesicles Facilitates Cell Infection and Protects the Virus from Neutralizing Antibodies. *J Virol* 96.
37. Mendez E, Fernandez-Luna T, Lopez S, Mendez-Toss M, Arias CF. 2002. Proteolytic Processing of a Serotype 8 Human Astrovirus ORF2 Polyprotein. *J Virol*.
38. Aguilar-Hernández N, López S, Arias CF. 2018. Minimal capsid composition of infectious human astrovirus. *Virology* 521:58–61.
39. Aguilera-Flores C, López T, Zamudio F, Sandoval-Jaime C, Pérez EI, López S, DuBois R, Arias CF. 2022. The Capsid Precursor Protein of Astrovirus VA1 Is Proteolytically Processed Intracellularly. *J Virol* 96.
40. Janowski AB, Bauer IK, Holtz LR, Wang D. 2017. Propagation of Astrovirus VA1, a Neurotropic Human Astrovirus, in Cell Culture. *J Virol* 91.
41. Aguilera-Flores C. 2020. Caracterización del crecimiento y del procesamiento de la proteína de la cápside del astrovirus neurotrópico VA1.
42. Espinosa R, López T, Bogdanoff WA, Espinoza MA, López S, DuBois RM, Arias CF. 2019. Isolation of Neutralizing Monoclonal Antibodies to Human Astrovirus and Characterization of Virus Variants That Escape Neutralization. *J Virol* 93.
43. Meyer CT, Bauer IK, Antonio M, Adeyemi M, Saha D, Oundo JO, Ochieng JB, Omore R, Stine OC, Wang D, Holtz LR. 2015. Prevalence of classic, MLB-clade and VA-clade Astroviruses in Kenya and the Gambia Emerging viruses. *Virology* 475:1–7.
44. Sandoval-Jaime C, Green KY, Sosnovtsev S V. 2015. Recovery of murine norovirus and feline calicivirus from plasmids encoding EMCV IRES in stable cell lines expressing T7 polymerase. *J Virol Methods* 217:1–7.
45. Ykema M, Tao YJ. 2021. Structural Insights into the Human Astrovirus Capsid.

Viruses 2021, Vol 13, Page 821 13:821.

46. Sreelatha L, Malakar S, Songprakhon P, Morchang A, Srisawat C, Noisakran S, Yenchitosomanus P, Limjindaporn T. 2019. Serine protease inhibitor AEBSF reduces dengue virus infection via decreased cholesterol synthesis. *Virus Res* 271.
47. Van Der Gucht W, Leemans A, De Schryver M, Heykers A, Caljon G, Maes L, Cos P, Delpitte PL. 2017. Respiratory syncytial virus (RSV) entry is inhibited by serine protease inhibitor AEBSF when present during an early stage of infection. *Virol J* 14.
48. Romero-Brey I, Bartenschlager R. 2014. Membranous Replication Factories Induced by Plus-Strand RNA Viruses. *Viruses* 6:2826.
49. Hassan Z, Kumar ND, Reggiori F, Khan G. 2021. How Viruses Hijack and Modify the Secretory Transport Pathway. *Cells* 10.
50. Janowski AB, Jiang H, Fujii C, Owen MC, Bricker TL, Darling TL, Harastani HH, Seehra K, Tahan S, Jung A, Febles B, Blatter JA, Handley SA, Parikh BA, Lulla V, Cm Boon A, Wang D, Louis U. 2022. The highly conserved stem-loop II motif is important for the lifecycle of astroviruses but dispensable for SARS-CoV-2. *bioRxiv* 2022.04.30.486882.
51. Rajewska M, Wegrzyn K, Konieczny I. 2012. AT-rich region and repeated sequences - the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS Microbiol Rev* 36:408–434.
52. Biswal JK, Subramaniam S, Ranjan R, Pattnaik B. 2017. Uncleaved 2A-peptide of foot-and-mouth disease virus can display foreign epitope-tag at the virion surface. *Infect Genet Evol* 54:324–329.
53. Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, Stuart DI, Grimes JM, Mancini EJ. 2009. Crystal Structure of a Novel Conformational State of the Flavivirus NS3 Protein: Implications for Polyprotein Processing and Viral Replication. *J Virol* 83:12895–12906.
54. Cohen L, Bénichou D, Martin A. 2002. Analysis of Deletion Mutants Indicates that the 2A Polypeptide of Hepatitis A Virus Participates in Virion

Morphogenesis. *J Virol* 76:7495–7505.

55. Wahaab A, Mustafa BE, Hameed M, Stevenson NJ, Anwar MN, Liu K, Wei J, Qiu Y, Ma Z. 2022. Potential Role of Flavivirus NS2B-NS3 Proteases in Viral Pathogenesis and Anti-flavivirus Drug Discovery Employing Animal Cells and Models: A Review. *Viruses* 14.
56. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. 2021. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 19:155–170.
57. Janowski AB, Klein RS. 2019. Differential In Vitro Infection of Neural Cells by Astroviruses. *MBio* 10:1–14.



The Capsid Precursor Protein of Astrovirus VA1 Is Proteolytically Processed Intracellularly

Catalina Aguilera-Flores,^a Tomás López,^a Fernando Zamudio,^b Carlos Sandoval-Jaime,^a Edmundo I. Pérez,^c Susana López,^a Rebecca DuBois,^c Carlos F. Arias^a

^aDepartamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^bDepartamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^cDepartment of Biomolecular Engineering, University of California Santa Cruz, Santa Cruz, California, USA

ABSTRACT Human astrovirus VA1 has been associated with neurological disease in immunocompromised patients, and its recent propagation in cell culture has opened the possibility to study its biology. Unlike classical human astroviruses, VA1 growth was found to be independent of trypsin during virus replication *in vitro*. In this work, we show that despite its independence on trypsin activation for cell infection, the VA1 capsid precursor protein, of 86 kDa (VP86), is processed intracellularly, and this proteolytic processing is important for astrovirus VA1 infectivity. Antibodies raised against different regions of the capsid precursor showed that the polyprotein can be processed starting at either its amino- or carboxy-terminal end, and they allowed us to identify those proteins of about 33 (VP33) and 38 (VP38) kDa constitute the core and the spike proteins of the mature infectious virus particles, respectively. The amino-terminal end of the spike protein was found to be Thr-348. Whether the protease involved in intracellular cleavage of the capsid precursor is of viral or cellular origin remains to be determined, but the cleavage is independent of caspases. Also, trypsin is able to degrade the capsid precursor but has no effect on VP33 and VP38 proteins when assembled into virus particles. These studies provide the basis for advancement of the knowledge of astrovirus VA1 cell entry and replication.

IMPORTANCE Human astrovirus VA1 has been associated with neurological disease in immunocompromised patients. Its recent propagation in cell culture has facilitated the study of its biology. In this work, we show that despite the ability of this virus to grow in the absence of trypsin, a marked feature of human classical astroviruses, the capsid precursor protein of astrovirus VA1 is cleaved intracellularly to yield the mature infectious particles, formed by two polypeptides, VP33 that constitutes the core domain of the virus particle, and VP38 that forms the spike of the virus. These studies provide a platform to advance our knowledge on astrovirus VA1 cell entry and replication.

KEYWORDS VA1 astrovirus, proteolytic cleavage, RNA virus, capsid processing, plus-strand RNA virus

Human astrovirus (HAstV) is an important etiological agent of gastroenteritis, affecting mainly children, the immunocompromised, and the elderly (1, 2). Most of these infections are associated with the so-called canonical or classic HAstVs, which comprise eight different serotypes (HAstV-1 to -8) (1). In recent years, highly divergent MLB and VA genotypes of human astroviruses have been detected in stool samples, although their association with gastroenteritis has not been clearly demonstrated yet (3, 4). They have also been reported as a cause of meningitis and encephalitis in immunosuppressed patients, increasing the interest in the study of these viruses (3). The most commonly associated astrovirus genotype in human neurological disease is VA1. A recent report on the seroprevalence of neutralizing antibodies from two cohorts of

Editor Colin R. Parrish, Cornell University

Copyright © 2022 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Carlos F. Arias, arias@ibt.unam.mx.

The authors declare no conflict of interest.

Received 26 April 2022

Accepted 6 June 2022

Published 28 June 2022

adult and pediatric serum samples found the seropositivity rate in adults to be approximately 77%, and it was concluded that a majority of humans are exposed to VA1 between 2 and 9 years of age (5).

HAstVs are small, nonenveloped viruses with a single-stranded, positive-sense RNA genome of about 6.8 kb that comprises three open reading frames (ORFs). ORFs 1a and 1b encode the virus nonstructural proteins, including a VPg, a viral protease, and the RNA-dependent RNA polymerase, while ORF2 codes for the virus capsid precursor protein (1, 6). Viral and cellular proteases are involved in processing polyproteins nsp1a and nsp1ab to produce the functional nonstructural proteins of the virus (6, 7). On the other hand, the capsid precursor structural polyprotein (VP90) of HAstV-8 self-assembles intracellularly and is processed by caspases to produce a virus particle formed by a 70-kDa protein (VP70) (7). This immature particle egresses from the cell and is further processed by extracellular proteases; *in vitro*, the treatment of this particle with trypsin yields a mature infectious virus formed by two protein species, VP34 and VP27 (7, 8). VP34 constitutes the shell of the virus particle (core domain) and VP27 constitutes the 30 dimeric globular spikes that protrude from the virion (spike domain) (7–9). Trypsin treatment has been shown to increase the infectivity of HAstV 10³ to 10⁵-fold (10–12).

Human astrovirus VA1 has been adapted to grow in cell culture, and it has been shown that its infectivity does not depend on trypsin treatment (13). However, it has not been determined if the ORF2 precursor protein is proteolytically cleaved during virus replication and its possible role on infection. In this work, we show that the VA1 capsid precursor protein, of approximately 86 kDa (VP86), is processed intracellularly through a collection of intermediate cleavage products to generate final products of about 33 (VP33) and 38 (VP38) kDa. These proteins form, respectively, the core and spike domains, of mature infectious virus particles. We also show that caspases and trypsin are not involved in the proteolytic processing pathway of VP86 and that the cleavage of this precursor is important for cell infection.

RESULTS

The VA1 capsid precursor protein is proteolytically processed. It has been shown that VA1 does not require trypsin treatment to activate its infectivity, and in concordance with this observation, the virus was reported to grow in the presence of 10% fetal calf serum (FCS) (13). To evaluate the effect of FCS on the production of the VA1 capsid protein, human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells were infected with trypsin-untreated virus at a multiplicity of infection (MOI) of 3, and were incubated for various times, and up to 120 h postinfection (hpi). At the indicated times the cell media was removed, the cells were harvested, and the synthesis of viral proteins was assessed by Western blotting analysis. For this, a rabbit hyperimmune serum (antibody DB) raised against a recombinant protein encoding the predicted core domain and subsequent linker region of the VA1 capsid protein was used (see Materials and Methods). We found no major differences in the kinetics of intracellular viral protein synthesis in the presence or absence of 10% FCS, but most surprisingly was the observation that the capsid precursor protein of approximately 86 kDa was processed into smaller polypeptides between 30 and 40 kDa under both conditions (Fig. 1A and B). The fact that processing occurs in the absence of trypsin in the cell medium, and also in the presence of FCS in the extracellular medium, suggests that the cleavage occurs intracellularly. We started to detect viral proteins at 24 hpi, and their synthesis seemed to reach a plateau at 48 hpi (Fig. 1). Of relevance, at least 6 protein bands were recognized, which are presumably proteolytic products of the capsid precursor protein, with apparent molecular weights ranging from 33 to 86 kDa. The number of these bands varied in different experiments, suggesting that some of them are intermediate cleavage products that most likely render the proteins that constitute the mature virus.

Single-cycle replication cycle of VA1. A single-cycle growth curve was performed in the absence of serum to characterize the replication kinetics of VA1 in Caco-2 cells. For this, cells were infected with an MOI of 5, and at 0 to 72 hpi the extracellular medium and

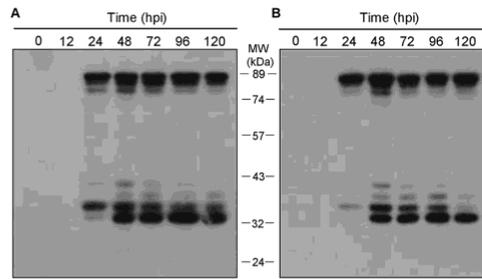


FIG 1 The capsid precursor protein of astrovirus VA1 is proteolytically processed. Monolayers of Caco-2 cells were infected with VA1 at an MOI of 3 in the presence (A) or absence (B) of 10% FCS in DMEM-HG, and the infection was left to proceed for the indicated times postinfection (hpi) at 37°C. At the end of the incubation periods the cell media was removed, and the cell monolayers were washed twice with DMEM-HG and lysed by three cycles of freeze-thawing. Laemmli sample buffer was added to the samples, and they were analyzed by Western blotting using a rabbit hyperimmune serum (antibody BD). The molecular weight (MW) markers are indicated.

the cells were independently collected and the amount of infectious virus was determined in each fraction (Fig. 2). We observed an eclipse period of approximately 12 h, followed by a burst phase from 12 to 48 hpi, in which infectious viral particles are produced and accumulate inside the cells. The stationary phase started at 48 hpi, a stage in which virus production markedly slows. On the other hand, the virus was detected in the extracellular medium starting at 18 hpi, and increased gradually until the released particles reached about 10% of the total infectious virus produced at 72 hpi.

Identification of the proteins that compose the mature infectious virus. To characterize the capsid precursor and proteolytic products encoded by VA1 ORF2, rabbit polyclonal antibodies were prepared against two recombinant proteins produced in *E. coli* and against two synthetic peptides. These immunogens were chosen to generate antibodies that specifically recognize the core domain and subsequent linker region (antibody DB), a smaller fragment of the core (α -core), spike (α -spike), and carboxyl-terminal (α -COOH) regions of the precursor protein, based on what is known of these regions in the capsid protein precursor of classical astroviruses (7) (See Material and Methods, and Fig. 3A). These antibodies were used to analyze by Western blotting a preparation of purified VA1 virus and a lysate of VA1-infected Caco-2 cells harvested at 48 hpi. In the infected cell lysate, the DB antibody recognized a major precursor protein of 86 kDa and a minor second precursor of about 80 kDa. Four additional proteins, of 33, 36, 38, and

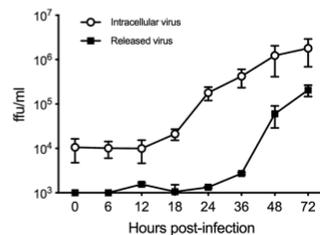


FIG 2 Single-cycle replication curve of astrovirus VA1. Monolayers of Caco-2 cells were infected with VA1 at an MOI of 5 in DMEM-HG, and the infection was left to proceed for the indicated times postinfection (hpi) at 37°C. At the end of the incubation periods the cell media and the cell monolayers were collected independently; to this end, the medium was removed, and the cells were washed twice with DMEM-HG, additional medium was added, and the cells were lysed by three cycles of freeze-thawing. The virus titer in both fractions was determined by an immunoperoxidase focus-forming assay as described in Materials and Methods. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

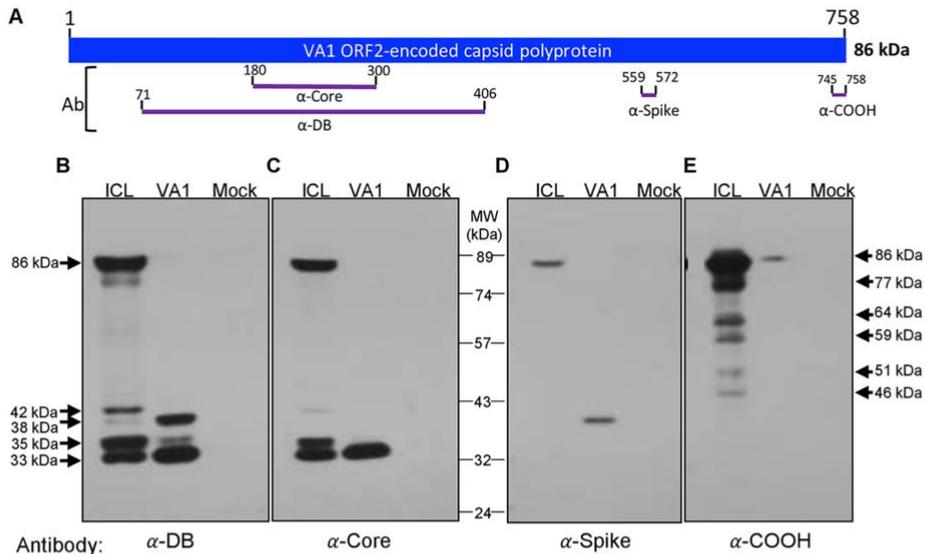


FIG 3 (A) Diagram of the VA1 ORF2 capsid precursor and recombinant proteins and peptides. ORF2 is represented as a box, and the recombinant proteins and the α -Spike and α -COOH peptides used to generate antibodies are represented as purple lines. The diagram is to scale, and the relative positions of the astrovirus VA1 recombinant proteins, Core and DB, and the peptides Spike and COOH are shown; the numbers indicate the VA1 ORF2 amino acid residues included in each protein or peptide. (B–E) Identification of the core and spike capsid proteins assembled in the mature, infectious virus. Monolayers of Caco-2 cells were mock infected or infected with VA1 at an MOI of 5, and the infection was left to proceed for 48 h at 37°C. At the end of the incubation period the cell media was discarded and the cell monolayers were washed twice with DMEM-HG and lysed by three cycles of freeze-thawing. Laemmli sample buffer was added, and the proteins were separated by 10% SDS-PAGE and analyzed by immunoblot using either (B) α -DB, (C) α -core, (D) α -spike, or (E) α -COOH antibodies. ICL, infected cell lysates; VA1, purified virus particles; Mock, mock infected cells. The MW markers are indicated between panels (C) and (D). The arrows at the left of panel (B) and at the right of panel (E) indicate the apparent molecular weight estimated for the viral proteins. The viral proteins of 33 and 38 kDa correspond to the core and spike domains of the mature, infectious virus (indicated).

42 kDa, were also recognized (Fig. 3B). On the other hand, when the purified virus was characterized with this hyperimmune serum, two major proteins were detected, of 33, and 38 kDa, suggesting that the DB antibody probably recognized regions in both the core protein and in the N-terminus of the spike protein (see below for 38 kD being the spike protein). A faint third protein of 35 kDa was also observed (Fig. 3B). When the polyclonal antibody against the core (α -core) was used, we found that it not only recognized the virus core domain, but also the 86-kDa precursor protein and three proteins of 33, 35, and 42 kDa in the infected cell lysate, while in the purified virus preparation, a single protein of 33 kDa was observed (Fig. 3C). These results indicate that the 33-kDa band corresponds to the mature core protein of the virus, while the proteins of 35 and 42 kDa appear to be processing intermediates of the final core protein assembled in the virus particle. In different experiments the precursor protein of 35 kDa showed an apparent molecular weight that ranged between 34.5 to 36.2 kDa, while the 42-kDa ranged between 40.5 and 42.6 kDa, suggesting that alternative cleavage sites can lead to the mature proteins assembled in the virus particles.

The antibody directed against the spike region (α -spike) only recognized the precursor 86-kDa protein in the infected cell lysate, and a protein of 38 kDa in the purified virus (Fig. 3D), indicating that this protein corresponds to the mature spike protein. Finally, the antibody directed against the carboxy terminus region of the ORF2-encoded polyprotein (α -COOH) recognized the precursor protein and intermediate processing products of various molecular weights in the cell lysate, and it only recognized trace amounts of the precursor protein in the purified virus (Fig. 3E), showing that the 86-kDa

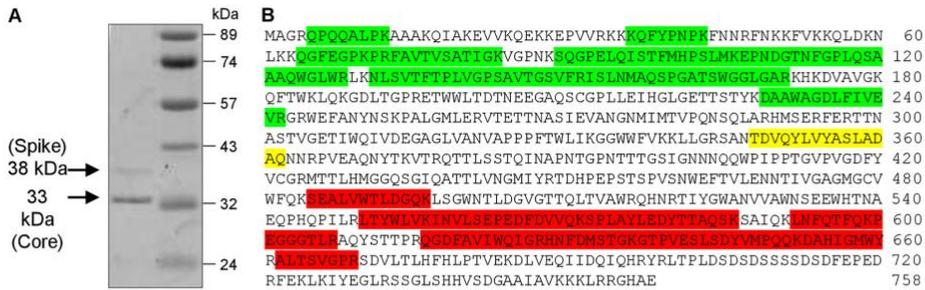


FIG 4 N-terminal sequence and mass spectrometry analyses of the mature virus capsid proteins. (A) Proteins from CsCl-purified virus were separated by 11% SDS-PAGE, stained with colloidal Coomassie blue, and detected using a laser scanner (Typhoon FLA 9500 from GE Healthcare) using near infrared detection. (B) Complete sequence of the VA1 capsid precursor protein (GenBank: 8289955). The peptides highlighted in green were identified by mass spectrometry of the 33-kDa protein and those highlighted in red correspond to the 38-kDa polypeptide. The amino-terminal sequence derived from the 38-kDa protein is highlighted in yellow.

protein is not present in the mature virus, or only in very minor proportion. These results indicate that the original DB antibody indeed recognizes the core protein, but also a portion of the spike protein. No protein bands were observed in uninfected cell lysates with any of the four anti-ORF2 protein antibodies evaluated (Fig. 3).

The identity of the VP33- and VP38-kDa proteins was confirmed by mass spectrometry analysis of the purified virus proteins separated by 11% SDS-PAGE (Fig. 4A). The tryptic peptides unambiguously identified the core and spike proteins (Fig. 4B).

Identification of the spike domain amino terminus. To determine the cleavage site that produces the core and spike proteins, virus particles were purified as described in Material and Methods, and the viral proteins were separated in an 11% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue. Only two major bands of 33 (VP33, core) and 38 kDa (VP38, spike) were observed (Fig. 4A). These bands were excised from the gel and subjected to amino-terminal sequencing by Edman's degradation. The amino terminus of VP33 did not yield a sequence, suggesting that the end of the core protein is blocked. On the other hand, the band corresponding to the VP38 protein rendered the sequence TDVQYLVIYASLADAQ, which corresponds to amino acid residues 348 to 362 of the VA1 ORF2-encoded polyprotein (Fig. 4B). These results further confirm the identification of the core and spike proteins present in the mature infectious virus, and identify the sequence at the amino-terminal end of VP38.

VA1 replication does not depend on caspase cleavage of the capsid precursor.

Classical astroviruses require that the intracellular 90-kDa capsid precursor, assembled in immature VP90 particles, is cleaved by caspases to VP70 for the egress of the VP70-particles to the extracellular medium (7). Thus, we explored whether this class of proteases could be involved in the intracellular proteolytic cleavage of the VA1 capsid polyprotein precursor. For this, Caco-2 cells were infected with VA1 at an MOI of 3 and incubated for 48 h in the presence of 50 μ M of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK, and the processing of the VA1 precursor protein was assessed by Western blotting using the DB antibody. The cleavage pattern of VA1 was the same, regardless of the presence or absence of the caspase inhibitor (Fig. 5A). As a positive control, Caco-2 cells were infected with HAstV-8 in the absence or presence of Z-VAD-FMK. In the absence of the inhibitor, the VP90 and VP70 forms were observed (14) (Fig. 5B), indicating the cleavage of the polyprotein precursor. On the other hand, in the presence of the inhibitor only the VP90 protein was detected, an indication that the VP90 to VP70 cleavage was prevented, as previously reported (14, 15). In addition to the results described above, we found that the production of infectious VA1 virus was not affected by the caspase inhibitor Z-VAD-FMK (Fig. 5C), confirming that the VA1 astrovirus capsid precursor is not processed by caspases.

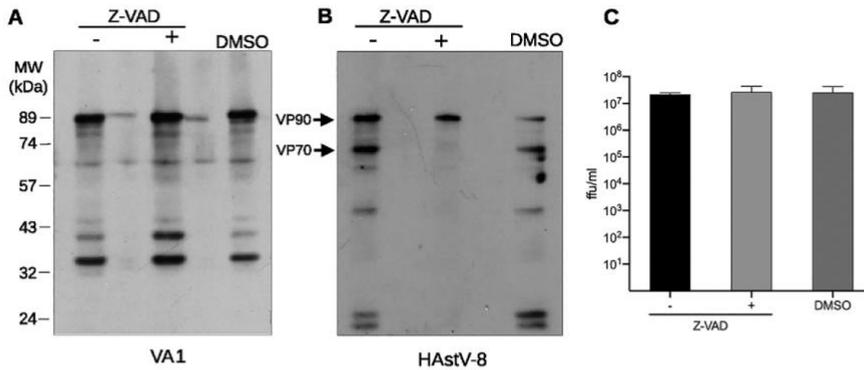


FIG 5 Caspases are not involved in processing the VA1 capsid precursor. Monolayers of Caco-2 cells were infected with either VA1 or HAstV-8 (strain Yuc8; previously activated by incubation with 200 μ g/mL of trypsin for 1 h at 37°C) at an MOI of 3. For this, the virus was adsorbed for 1 h at 37°C and then washed twice with MEM, and DMEM-HG (Z-VAD minus), DMEM-HG containing 50 μ M Z-VAD-FMK (Z-VAD plus), or DMEM-HG with the equivalent concentration of DMSO (DMSO) as a control, was added and the cells were incubated for 48 h at 37°C. After this time the cell media were discarded and the viral proteins in the cellular fraction were separated by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using (A) α -DB antibody to detect VA1, or (B) a rabbit polyclonal antibody to HAstV-8. (C) In parallel samples, the infectivity for astrovirus VA1 was determined by an immunoperoxidase focus-forming assay as described in Material and Methods. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

The VA1 capsid precursor is sensitive to trypsin cleavage. As stated above, unlike classical astroviruses, astrovirus VA1 does not need to be treated with trypsin to activate its infectivity. However, whether trypsin could cleave the VA1 capsid proteins and/or activate VA1 infectivity has not been analyzed. To evaluate this possibility, capsid proteins in the pellet and in the supernatant obtained during the virus purification method after centrifugation through a sucrose cushion, and prior to the cesium chloride (CsCl) gradient (see Materials and Methods), were treated with increasing amounts of trypsin for 1 h at 37°C and analyzed by Western blotting using the DB antibody, and the viral infectivity was also determined (Fig. 6).

The main protein detected in the supernatant (the material that did not go through the sucrose cushion) was the 86-kDa capsid precursor, which was completely degraded upon treatment with a concentration of 200 μ g/mL of trypsin (Fig. 6A). Of note, we detected a small amount of infectivity in these samples, treated or not with trypsin (Fig. 6B), suggesting that small amounts of infectious virus were present in the supernatant fraction, and that its infectivity was not affected by trypsin. In contrast, in the pelleted sample that went through the sucrose cushion, the 33-, 35- and 38-kDa proteins were enriched, although the 86-kDa precursor protein was also detected in the nontreated sample (Fig. 6C). Of interest, when this sample was treated with different concentrations of trypsin, the 86-kDa precursor protein was gradually degraded, as it had been seen in the supernatant sample, but the protease treatment did not affect the lower molecular weight proteins (Fig. 6C) and, similarly, the virus infectivity remained unchanged upon trypsin treatment (Fig. 6D). Altogether, these results suggest that the VA1 capsid proteins incorporated into mature, infectious virus are no longer sensitive to trypsin cleavage. In contrast, the 86-kDa precursor is either loosely assembled into virus particles and sensitive to trypsin degradation both in the supernatant and pellet fractions, or it is in a soluble form that was present in the supernatant and contaminated the sedimented virus. These findings also suggest that the infectious form of the virus is formed by the processed polypeptides and not by the precursor polypeptide.

DISCUSSION

In this work, we confirmed that, unlike classical human astroviruses, the neurotropic astrovirus strain VA1 does not need to be treated with trypsin to activate its infectivity.

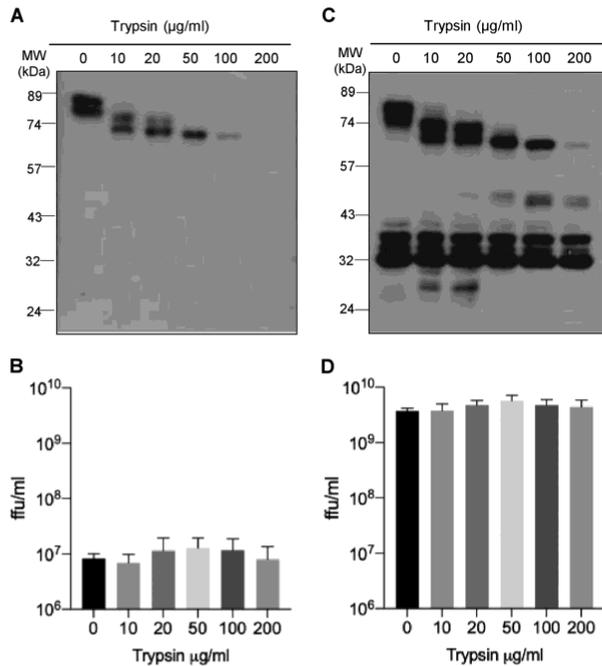


FIG 6 Trypsin cleavage of the VA1 capsid precursor does not lead to infectious virus. Monolayers of Caco-2 cells were infected with VA1 at an MOI of 5, and the infection was left to proceed for 48 h at 37°C. The cells were then scraped into the cell medium and processed for virus purification as described in Material and Methods; after centrifugation through a 1 mL 30% sucrose cushion in TNE buffer, the supernatant was collected and the pellet was resuspended in TNE buffer. Aliquots of both supernatant (A) and pellet (C) fractions were treated with the indicated concentrations of trypsin during 1 h at 37°C; the proteins were separated by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using the α -DB serum. The MW markers are indicated. Parallel aliquots of both supernatant (B) and pellet (D) fractions were used to determine the virus infectivity titer by an immunoperoxidase focus-forming assay as described in Material and Methods. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

However, we showed that the ORF2-encoded polyprotein is indeed proteolytically processed during virus replication and that this process is required to generate an infectious virus. The fact that the polyprotein precursor is cleaved during the virus replication cycle even in the presence of FCS, together with the observation that the cell-associated virus is also proteolytically cleaved in the absence of trypsin in the culture medium (Fig. 1), strongly supports the idea that the cleavage of the ORF2 precursor protein occurs intracellularly.

Using antibodies directed to different regions of the ORF2-encoded polyprotein we found that mature viruses are composed by two proteins, one of 33 kDa (VP33) that represents the core protein of the virus, and a second of 38 kDa (VP38) that constitutes the spike protein of the virus particle (Fig. 3). In addition, we detected several cleavage intermediate products of the ORF2 polyprotein during the cleavage pathway that yields VP33 and VP38. The intermediate products detected varied from experiment to experiment and were also dependent on the antibody used. For instance, when antibodies directed to the carboxy terminus of the polyprotein precursor were used, in addition to the 86-kDa precursor protein (VP86), bands ranging from about 46 to 77 kDa were observed. This indicates that the ORF2 capsid protein can be shortened

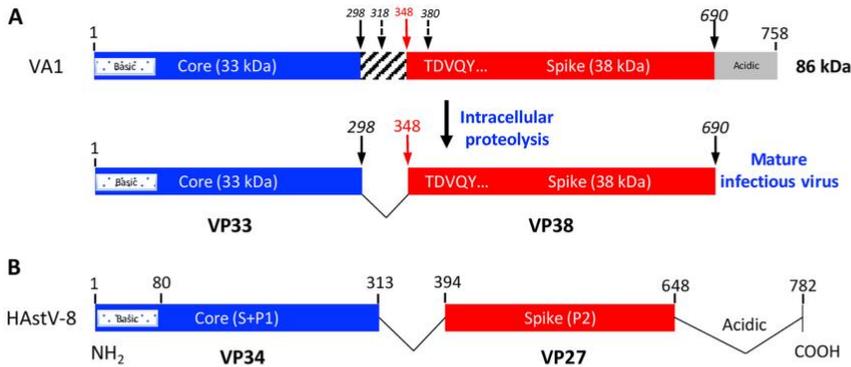


FIG 7 (A) Proposed proteolytic processing for the VA1 ORF2 capsid precursor. The blue and red boxes represent the protein products observed during virus replication; the striped box represent a connecting peptide that is probably lost during the maturation process of the precursor. The basic and acidic domains of the precursor are indicated. The red arrow indicates the amino terminus of the spike domain VP38 determined by N-terminal sequencing of the protein; the continuous black arrows represent the estimated carboxy terminus of VP33 and VP38, based on the calculated apparent molecular weights of the proteins that constitute the mature, infectious virus; the dashed arrows represent cleavages that produce intermediate proteolytic products that produce core proteins precursors VP36 and VP42. (B) Trypsin cleavage products that constitute the mature, infectious human serotype 8 classical astrovirus.

by cleavage from the amino terminus of the precursor to render at least 5 intermediate products (Fig. 3D). On the other hand, when antibodies to the core were used, it appears that processing of VP86 can also start at the carboxy-terminal region, since intermediate products of 35 and 42 kDa were observed (Fig. 3B). Thus, there seems to be alternative cleavage pathways that finally converge to render VP33 and VP38, the two polypeptides that constitute the mature infectious virus. The 35-kDa core intermediate product was always very abundantly observed in infected cells, although it was not detected in the mature virus. The expected molecular weight of the precursor protein, based on the amino acid composition of ORF2 that encodes a polypeptide of 758 amino acids is 84.2 kDa; however, the apparent molecular weight observed is 86 kDa. Whether this is due to atypical migration of the band during electrophoresis or post-translational modifications to the capsid protein is not clear.

A diagram showing the expected final products of the proteolytic cleavage pathway is shown in Fig. 7A, as well as the various potential protease cleavage sites deduced from the molecular weight of the core intermediate products. Considering the molecular weight of VP33 and the identified amino terminus of the spike, it seems that a segment of about 50 amino acids, is lost from the precursor protein, as has also been observed for the processing of the VP70 protein of HAstV-8 (11, 16). Our results, along with structural predictions, also suggest that the N-terminal region of the VA1 spike protein contains one or more beta strands between residues 350–385 that tether it to the core protein, like the N-terminal region of the spike of classical human astroviruses (17). Of interest, the spike protein of VA1 is larger than the core protein, as opposed to that observed in classical human astroviruses (Fig. 7B) (7). It will be very interesting to determine the structures of these proteins as well as the VA1 virus particle to understand the structural basis for these differences.

In contrast to what has been previously shown to occur for HAstV-8, caspases were not found to be involved in the processing of the VA1 VP86 precursor. On the other hand, and as expected, trypsin treatment did not affect the VP33 and VP38 proteins once they were assembled into VA1 virions (Fig. 5), given that the virus infects in a trypsin-like environment in the human gut. However, the precursor protein and most of the intermediate products were readily digested by trypsin, suggesting that the

nonparticulated precursor protein is sensitive to this protease. Alternatively, it is possible that assembled VP86 is susceptible to trypsin cleavage before it is processed into VP33 and VP38. Furthermore, the observation that the infectivity of the virus did not decrease despite the precursor protein being completely degraded after trypsin treatment, indicates that the infectious virus form is constituted by the processed core and spike polypeptides.

Whether the protease involved in the cleavage of VP86 is of cellular or viral origin remains to be determined, although the participation of more than one protease is also possible. We are currently investigating the origin of the protease(s), but if a viral protease is involved, it will represent a major difference with classical astroviruses. Also, the fact that this virus has been reported to infect and replicate in neural cells and to be associated with encephalitis/meningitis in immunosuppressed individuals is consistent with its independence of trypsin activation *in vivo*; these observations are also consistent with the involvement of an intracellular or viral protease in the process.

In this work we also report a single-cycle replication curve of VA1, assessing the production of infectious virus associated to cells and released into the cell medium up to 72 hpi. The replication cycle seems to be completed in 48 h, with an eclipse period of about 12 h. Remarkably, no cytopathic effect was observed. These observations are similar to those previously reported for VA1 multistep growth curves carried out in Caco-2 cells (13, 18), in which genome viral copies rather than infectious virus were assessed. Also, similar growth curves were reported in HEK293T and A549 cells (13), human intestinal enteroids (19), and neural cells (18). These observations contrast with the replication cycle of HAstV-8 in Caco-2 cells, which has an eclipse period of about 6 to 8 h and the synthesis of infectious viruses plateau at 24 hpi, although with the caveat that the reported single-cycle growth curve was carried out at an MOI of 10 (16 [unpublished data]); these observations suggest a more efficient replication cycle of classical viruses in human cells. The findings reported in this work advance our knowledge about the biology of the neurotropic VA1 human astrovirus and set the basis to better understand the process of virus entry and the proteolytic cleavage of viral polyproteins.

MATERIALS AND METHODS

Virus and cells. Cells from a human colon adenocarcinoma (Caco-2), clone C2Bbe, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) were used in this work. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium-reduced serum (DMEM) (DMEM-RS; Thermo Scientific HyClone, Logan, UT, USA) supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Biowest, Kansas City, MO, USA) at 37°C in a 10% CO₂ atmosphere. Astrovirus VA1 (AstV-VA1) was kindly provided by David Wang (Washington University) and propagated in Caco-2 cells. The virus, at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01–0.001, was adsorbed to the cells for 1 h at 37°C. The unbound virus was removed, and the cells were incubated for 4 days at 37°C in DMEM (Sigma Cat. D7777), supplemented with nonessential amino acids (Gibco Cat. 11140) without serum. Finally, the cells were washed twice with DMEM-HG and lysed by three cycles of freeze-thawing. The resulting infected cell lysate was aliquoted and stored at –70°C. Astrovirus serotype 8 (HAstV-8) at an MOI of 0.5 was adsorbed to Caco-2 cells; the virus inoculum was previously activated with trypsin (200 µg/mL, Gibco Cat. 27250-18) for 1 h at 37°C, and soybean trypsin inhibitor (200 µg/mL) was added just before inoculation to the cells. After this time the unbound virus was removed, and minimum essential medium (MEM) without serum was added. The infected cells were incubated at 37°C and harvested 3 days postinfection. Finally, the cells were washed twice with DMEM-HG and lysed by three cycles of freeze-thawing. The resulting viral lysate was aliquoted and stored at –70°C.

Antibodies. A protein containing amino acid residues 71 to 403 of VA1 ORF2 (GenBank accession number NC_013060.1) was synthesized in *E. coli* and purified as described (20) and used to generate a hyperimmune serum in New Zealand rabbits, as previously reported (21) (DB antibody). Similarly, a polypeptide containing amino acid residues 180 to 300 of VA1 ORF2 was produced in *E. coli* as a fusion with glutathione S-transferase (GST) using the pGEX-4T-1 vector (Pharmacia). A hyperimmune rabbit serum was produced as above (α-core antibody). Two synthetic peptides and their corresponding rabbit anti-antibodies were obtained from GeneScript. These peptides represent ORF2 amino acids 559-VLSEPEDFDVVQKS-572 (α-spike antibody) and 745-AIAVKKKLRGHAEE-758 (α-COOH antibody). Both antibodies had an extra cysteine added at the amino terminus. Antibodies to HAstV-8, strain Yuc8, have been reported (11).

Virus purification. VA1 virus was purified as reported (8, 12), with some modifications. Briefly, confluent monolayers of Caco-2 cells were infected with VA1 at an MOI of 5, and the cells were incubated for 48 h at 37°C. The cells were then scraped into the cell medium, and centrifuged at 2000 × *g* for 10 min at 4°C. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 1% Triton X-100 (Sigma) in TNE buffer

(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 10 mM EDTA) and incubated for 30 min on ice with frequent stirring. After centrifugation at $2000 \times g$ for 10 min at 4°C, the supernatant was collected and ultracentrifuged at $50,000 \times g$ for 16 h at 4°C. The resulting pellet was resuspended in 4 mL of TNE buffer and sonicated to better solubilize the pellet. This suspension was centrifuged through a 1 mL 30% sucrose cushion in TNE buffer at $200,000 \times g$ for 2 h at 4°C. The virus in the pellet was then purified by CsCl density centrifugation. For this, the pellet was resuspended in 4 mL TNE, sonicated, and 2.4 g of CsCl were added. After centrifugation at $160,000 \times g$ for 18 h at 4°C the opalescent band corresponding to viral particles was collected by puncture with a syringe needle, diluted to a 5 mL final volume with TNE, and centrifuged at $200,000 \times g$ for 2 h at 4°C. The resulting pellet was resuspended in 400 μ L TNE.

Infectivity assay. Caco-2 cells were grown to confluence in 96-well plates. The cells were infected with 50 μ L of 2-fold serial dilutions of the viral lysate for 1 h at 37°C. Then, the non-adsorbed virus was removed, and the cells were incubated at 37°C for 48 h. Afterward, the cell monolayers were processed for an immunoperoxidase assay. Briefly, the cell monolayers were fixed with 2% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 20 min at room temperature and then washed twice with PBS. The cell membrane was then permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma) in PBS for 15 min at room temperature. Next, samples were immunostained using a monoclonal neutralizing antibody (2A2) (5), followed by incubation with protein A coupled to peroxidase. Finally, the cells were washed twice with PBS and stained with 50 μ L of a solution containing 1 mg/mL of 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC), 0.04% H₂O₂, and sodium acetate buffer (50 mM, pH 5). The reaction was stopped by washing in tap water. The number of focus forming units (FFU) was determined in a Nikon TMS inverted phase-contrast microscope with a 20x objective. The virus titer was expressed as FFU/mL.

Western blots. Cell monolayers grown to confluence in 48-well plates were infected at an MOI of 3 or 5, depending on the experiment. After 48 h of incubation at 37°C, cells were lysed in Laemmli sample buffer. The proteins were separated in a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to Immobilon NC membranes (Millipore Merck, Darmstadt, Germany). The membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in PBS for 1 h at room temperature and then incubated with primary antibodies (DB 1:2000, α -core 1:2000, α -spike 1:2000, α -COOH 1:2000, α -HAstV-8 1:2000) diluted in PBS containing 0.1% non-fat dry milk. The membranes were then incubated with anti-IgG rabbit antibodies conjugated to horseradish peroxidase (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA), and developed using the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer). To determine the apparent molecular weight (MW) of the proteins in the developed films, we used the PageRuler prestained protein ladder (Product no. 26616, Thermo Scientific). However, since the proteins in this ladder are bound to chromophores, their MW are only approximate, and vary by about 5% from lot-to-lot. Thus, we recalibrated the MW of these markers with the PageRuler unstained protein ladder (Product no. 26614, Thermo Scientific) for a more precise MW determination. The apparent MW shown in the Western blot images correspond to the calibrated MW.

ZVAD and trypsin treatments. Caco-2 cells grown in a 48-well plate were infected with either VA1 or Yuc8 at an MOI of 3 (an MOI of 5 was used for the VA1 trypsin treatment experiment). The virus was adsorbed for 1 h at 37°C and then washed twice with MEM. Cells were treated with DMEM-HG containing 50 μ M Z-VAD-FMK (627610; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), or DMEM-HG with the equivalent concentration of DMSO as a control. For both viruses, the cells were incubated for 48 h at 37°C and then frozen and thawed 3 times. The infectivity of astrovirus VA1 was determined by an immunoperoxidase assay, and the viral protein production of both viruses was analyzed by Western blotting, using the α -DB serum to VA1, or a rabbit polyclonal antibody to HAstV-8. For the trypsin-treatment assays, the supernatant and pellet obtained after virus centrifugation through a sucrose cushion (see above) were treated with different trypsin concentrations (0, 10, 20, 50, 100, and 200 μ g/mL) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 1 h at 37°C. Each treated sample was split into two fractions. One fraction was used to determine the viral infectivity immediately after trypsin treatment, and the proteins in the second fraction were separated in 10% SDS-polyacrylamide gels and analyzed for Western blot.

N-terminal protein sequencing. CsCl-purified virus particles, were separated by SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF-Plus 0.1 μ m; Osmonics) for 1 h at 50 V in CAPS (3-[cyclohexylamine]-1-propane sulfonic acid) buffer (10 mM CAPS [pH 11], 10% methanol). All reagents used were freshly prepared and filtered through a 0.22 μ m pore-size membrane. Transferred proteins were visualized by staining with Ponceau-S, and the bands were excised, washed thoroughly with MilliQ water, and dried in a dust-free environment. Automatic amino acid sequencing determination, by Edman degradation was performed using a PPSQ-31A Protein Sequencer from Shimadzu Scientific Instruments, Inc. (Columbia, MD, USA), using the PVDF membrane with the transferred protein.

LC-MS. Purified viral particles were analyzed by 11% SDS-PAGE, and the gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma, St. Louis, MO, USA). The 33- and 38-kDa proteins were cut out and the polyacrylamide slices were sent to the Proteomic University Laboratory facility at the Instituto de Biotecnología, UNAM (Cuernavaca, Mexico) for their identification by nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nano LC-MS/MS).

Statistics. Statistical analysis was determined by a two-tailed T-test with a confidence interval of 99%, using the GraphPad Prism 9.0.1 Software (GraphPad Software, Inc.).

ACKNOWLEDGMENTS

This research was partially supported by grants NIH R01 AI144090 to R.M.D. and C.F.A., CONACyT M0037-Fordecyt 302965 to S.L.; and DGAPA IN210120 to T.L.

We are grateful to David Wang (Washington University) for kindly providing human astrovirus VA1. We thank Rafaela Espinosa for her advice and help in cell culture, and we also thank E. Mata and the animal house personnel for help during animal handling and immunization.

REFERENCES

- Méndez E, Arias CF. 2013. Astroviruses, p 609–628. In Knipe DM, Howley PM (ed), *Fields Virology*, 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
- Olorategui MP, Rouhani S, Yori PP, Salas MS, Trigoso DR, Mondal D, Bodhidatta L, Platts-Mills J, Samie A, Kabir F, Lima A, Babji S, Shrestha SK, Mason CJ, Kalam A, Bessong P, Ahmed T, Mduma E, Bhutta ZA, Lima I, Ramdass R, Moulton LH, Lang D, George A, Zaidi AKM, Kang G, Houpt ER, Kosek MN, Network M-E, on behalf of the MAL-ED Network. 2018. Astrovirus infection and diarrhea in 8 countries. *Pediatrics* 141:e20171326. <https://doi.org/10.1542/peds.2017-1326>.
- Vu DL, Bosch A, Pinto RM, Guix S. 2017. Epidemiology of classic and novel human astrovirus: Gastroenteritis and beyond. *Viruses* 9:33. <https://doi.org/10.3390/v9020033>.
- Vu DL, Sabria A, Aregall N, Michl K, Sabria J, Rodriguez Garrido V, Goterres L, Bosch A, Pinto RM, Guix S. 2020. A Spanish case-control study in <5 year-old children reveals the lack of association between MLB and VA astrovirus and diarrhea. *Sci Rep* 10:1760. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58691-3>.
- Janowski AB, Owen MC, Dudley H, Lopez T, Espinosa R, Elvin-Lewis M, Colichon A, Arias CF, Burbelo PD, Wang D. 2021. High seropositivity rate of neutralizing antibodies to astrovirus VA1 in human populations. *mSphere* 6:e0048421. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00484-21>.
- Bosch A, Pinto RM, Guix S. 2014. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev* 27:1048–1074. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-14>.
- Arias CF, DuBois RM. 2017. The astrovirus capsid: A review. *Viruses* 9:15. <https://doi.org/10.3390/v9010015>.
- Aguilar-Hernández N, López S, Arias CF. 2018. Minimal capsid composition of infectious human astrovirus. *Virology* 521:58–61. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.05.021>.
- Dryden KA, Tihova M, Nowotny N, Matsui SM, Méndez E, Yeager M. 2012. Immature and mature human astrovirus: structure, conformational changes, and similarities to hepatitis E virus. *J Mol Biol* 422:650–658. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.06.029>.
- Bass DM, Qiu S. 2000. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. *J Virol* 74:1810–1814. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.4.1810-1814.2000>.
- Méndez E, Fernández-Luna T, López S, Méndez-Toss M, Arias CF. 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J Virol* 76:7996–8002. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.16.7996-8002.2002>.
- Sanchez-Fauquier A, Carrascosa AL, Carrascosa JL, Otero A, Glass RI, Lopez JA, San Martin C, Melero JA. 1994. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. *Virology* 201:312–320. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1296>.
- Janowski AB, Bauer IK, Holtz LR, Wang D. 2017. Propagation of astrovirus VA1, a neurotropic human astrovirus, in cell culture. *J Virol* 91:e00740-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00740-17>.
- Méndez E, Salas-Ocampo E, Arias CF. 2004. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J Virol* 78: 8601–8608. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.16.8601-8608.2004>.
- Baños-Lara MdR, Méndez E. 2010. Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism. *Virology* 401:322–332. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.028>.
- Méndez E, Murillo A, Velázquez R, Burnham A, Arias CF. 2013. Replication cycle of astroviruses, p 19–45. In Schultz-Cherry S (ed), *Astrovirus research*. Springer, New York.
- Ykema M, Tao YJ. 2021. Structural insights into the human astrovirus capsid. *Viruses* 13:821. <https://doi.org/10.3390/v13050821>.
- Janowski AB, Wang D. 2019. Infection and propagation of astrovirus VA1 in cell culture. *Curr Protoc Microbiol* 52:e73. <https://doi.org/10.1002/cpmc.73>.
- Kolawole AO, Mirabelli C, Hill DR, Svoboda SA, Janowski AB, Passalacqua KD, Rodriguez BN, Dame MK, Freiden P, Berger RP, Vu DL, Hosmillo M, O'Riordan MXD, Schultz-Cherry S, Guix S, Spence JR, Wang D, Wobus CE. 2019. Astrovirus replication in human intestinal enteroids reveals multi-cellular tropism and an intricate host innate immune landscape. *PLoS Pathog* 15:e1008057. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008057>.
- Espinosa R, López T, Bogdanoff WA, Espinoza MA, López S, DuBois RM, Arias CF. 2019. Isolation of neutralizing monoclonal antibodies to human astrovirus and characterization of virus variants that escape neutralization. *J Virol* 93:e01465-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01465-18>.
- Meyer CT, Bauer IK, Antonio M, Adeyemi M, Saha D, Oundo JO, Ochieng JB, Omoro R, Stine OC, Wang D, Holtz LR. 2015. Prevalence of classic, MLB-clade and VA-clade astroviruses in Kenya and The Gambia. *Virology* 478:1278–1285. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.05.029>.