



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Instituto de Biotecnología

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular

**Optimización de un sistema de genética reversa para
el estudio de astrovirus y su aplicación para determinar
el papel de la proteína viral sm.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

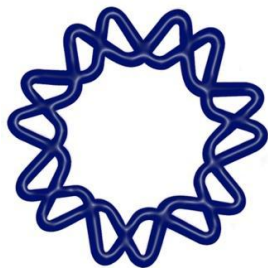
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

QFB. RODRIGO VELÁZQUEZ MOCTEZUMA

DIRECTOR DE TESIS

DR. ERNESTO MÉNDEZ SALINAS



CUERNAVACA, MORELOS



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.

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL DEPARTAMENTO DE GÉNETICA DEL DESARROLLO Y FISIOLÓGIA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO, CAMPUS MORELOS, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ERNESTO MÉNDEZ SALINAS, EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA DIRIGIDO POR LOS DOCTORES CARLOS F. ARIAS Y SUSANA LÓPEZ.

COMITÉ TUTORAL:

DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA

DR. JUAN ERNESTO LUDERT LEÓN

JURADO DE EXAMEN:

DR. GUSTAVO PEDRAZA ALVA

DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA

DR. RAMON GONZALEZ GARCÍA CONDE

DR. JOSE LUIS MONTIEL HERNÁNDEZ

DR. VICTOR BUSTAMANTE SANTILLAN

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

DONATIVO 79574. CONSEJO NACIONAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA.

DONATIVO IN-219910. DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DE PERSONAL.

Dedicatorias.

El presente trabajo lo dedico a aquellas personas que en este año que acaba de terminar, por uno u otro motivo dejaron de ser parte de mi vida. Quedando así como prueba escrita de su recuerdo.



A mi abuela materna Natividad Montaña, por aquellos años de mi niñez que pude compartir con ella en su casa. Al final de sus días su reciente ceguera la invitaba a la desesperación y a pesar de ello no se rindió hasta que su cuerpo, cansado de soportar tantas penas, tuvo que subyugar su voluntad. Ahora que no está aquí, la imagen de un niño al lado de sus abuelos observando un arcoíris en un día lluvioso, es la más clara imagen que tengo de su recuerdo. Descanse en Paz.

A mi abuela paterna Antonia Bribiesca. Jamás fui mal recibido por ella. Siempre me mostro su cariño y aunque pasaron los años, recuerdo muy bien cada beso en la frente que solía darme. La última vez la vi, estaba en una caja de madera, se veía tan apacible como aquel granjero que después de un día de labor regresa a su casa y se acuesta en su cama sabiéndose tranquilo de haber cumplido con su trabajo. Descanse en Paz.



De manera muy especial le dedico este trabajo a mi asesor y amigo Ernesto Méndez Salinas ya que por el esto se hizo posible.

Con él compartí muchos momentos por alrededor de 2 años y medio. Me enseñó muchas cosas, tanto fuera como dentro del lugar de trabajo. Él era un hombre íntegro, con grandes valores morales, un sentido de justicia y de responsabilidad que le hacían único. Además de eso era una de las mentes privilegiadas de este país, que tan poco nos da y mucho es lo que nos quita. Ahora les comparto parte de la vida que compartió conmigo, para que quede como digno ejemplo de la superación personal y como prueba de que los buenos hombres pueden existir incluso en esta sociedad tan demacrada.

Debido a la muerte de su madre, desde chico aprendió a ser responsable y organizado, lo cual se veía reflejado en su buen desempeño escolar y profesional. Después de concluir su licenciatura comenzó trabajando como técnico académico en la UNAM. Gracias a sus deseos de superación, a la par que trabajaba, pudo estudiar una Maestría y un Doctorado, siempre teniendo un excelente desempeño.

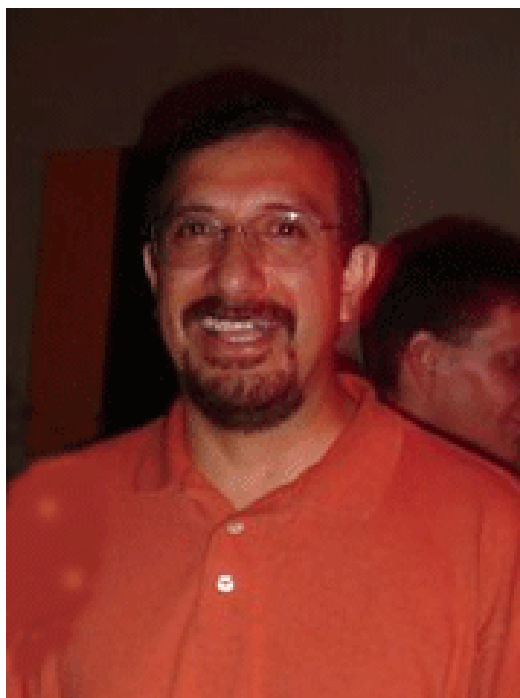
Cuando entre como su alumno, él ya era un científico consolidado en su área. Conforme lo fui conociendo me di cuenta de la genialidad y alegría que lo envolvía. Si algo me quedó claro es que él amaba su profesión. El amor por la ciencia se veía cada vez que tenía un nuevo reto frente a él. El descubrir algo que nadie más había visto, le apasionaba tanto que llegaba a contagiar a las personas que lo rodeaban. Recuerdo todas las veces que se me ocurrió preguntarle sobre alguna idea que tenía, yo llegaba con una y él sacaba otras 3. Siempre que ocurría esto, una sonrisa se asomaba mientras platicábamos. Esa sonrisa que solo tienen aquellos hombres que han llegado a conocer la felicidad que puede lograrse cuando amas lo que haces. Él amaba la ciencia y la ciencia era generosa con su entereza. Él era sin dudar el mejor especialista en el mundo en su área de estudio y esto lo logró gracias a su esfuerzo, pero sobretodo al amor tan grande que tenía al conocimiento.

En el terreno personal, llegamos a conocernos y realmente pude llegar a considerarlo más que un jefe, un amigo. Él era el verdadero ejemplo para la juventud que hace tanta falta en estos días. Jamás entendió por qué las personas necesitan malgastar su tiempo con alcohol o drogas para poder sentirse bien, mientras hay todo un mundo de cosas

por hacer y aprender. El creía que el principio de la felicidad, radicaba en la familia y en tener cerca a las personas que quieres y que te aprecian. Le gustaba practicar deporte, a últimas fechas lo acompañaba a jugar squash y fútbol, siendo este último su favorito. Su familia era una de las cosas más importantes para él, llegando incluso a sacrificar grandes oportunidades por el bien de ellos.

Lo que a mí me queda claro, es que él era un verdadero ejemplo a seguir como científico y aun mas como un ser humano. Nosotros llegamos a discutir muchas veces, pero así como discutíamos, así también, reímos mucho con cada una de sus bromas. Me aconsejaba y me reprendía por las cosas que hacía, inclusive por aquellas que no tenían que ver con el trabajo. Es fácil saber quiénes se preocupan por ti cuando no los tienes cerca.

Para finalizar voy a plasmar aquellos consejos que algún día me dio y que guardare por siempre en mi corazón, los cuales espero le sirvan a cualquiera que lea estas líneas. El me dijo algún día mientras me enseñaba a trabajar; "Cuando hagas algo, observa cada detalle y cada consecuencia de tus actos, porque solo así cuando te equivoques podrás saber cual camino tomar para no repetir tus errores". El segundo consejo me lo dijo en uno de mis mejores momentos, cuando obtuve muchos resultados positivos, y en mi acrecentada confianza, pensé en tener un merecido descanso. En ese momento el me dijo algo que a nadie se lo había escuchado decir; "Cuando todo te sale mal, normalmente la gente piensa que es cuando más debes trabajar para conseguir mejorar, sin embargo, creo que lo mejor es descansar, pensar y una vez que estas consciente del problema intentar resolverlo, ahora que, cuando las cosas van bien puedes pensar que ya hiciste tu trabajo, sin embargo, ese es el momento en el que debes avanzar, porque esa es la única manera de seguir adelante".



Descansa en paz querido amigo y consejero, que nosotros que te conocimos guardaremos tu legado y tu ejemplo, para que todos sepan que en este mundo, por muy terrible que sea, aun existen verdaderos hombres, capaces de redimirlo con sus acciones.

“Quiero agradecerles a todas las personas que de una u otra forma influyeron en este trabajo. De manera especial, al laboratorio de Carlos Arias y Susana López por todos los momentos que hemos compartido a lo largo de estos años”.

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	IX
INDICE DE TABLAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
ABREVIATURAS.	XIV
1. INTRODUCCIÓN:.....	1
1.1. Generalidades.	1
1.2. Organización del genoma y poliproteínas.	5
1.3. Ciclo replicativo.	9
2. ANTECEDENTES:	14
3. HIPÓTESIS:	18
4. OBJETIVOS:	18
4.1. Objetivos Particulares:	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	19
5.1. Células.	19
5.2. Virus.	19
5.3. Suero y Reactivos.	20
5.4. Titulación Viral.	21
5.5. Cinética de Infección.	22
5.6. Extracción de RNA.....	22
5.7. Transcripción in vitro a partir de la clona pAVIC.	23
5.8. Electroforesis de RNA.....	24
5.9. Transfección de células Huh7.5.1 y BHK-21	24
5.10. Western Blot.....	26
5.11. RT-PCR.....	27
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28

6.1._ Las células Huh7.5.1 son permisivas y susceptibles a la infección por HAstV-8 cepa Yuc8.	28
6.2._ Las células Huh7.5.1 son transfectables con RNA viral y capaces de producir progenie viral.	35
6.3._ Optimización del método de transfección.....	38
6.3.1._ <i>Optimización de la cantidad de RNA transfectado.</i>	39
6.3.2._ <i>Rendimiento viral utilizando diferentes cantidades de células.</i>	41
6.3.3._ <i>Rendimiento viral a diferentes tiempos de cosecha.</i>	43
6.4._ El RNA obtenido a partir de pAVIC al ser transfectado en células Huh7.5.1 produce virus infeccioso.	45
6.5._ El método desarrollado con Huh7.5.1 es mas eficiente que aquellos previamente descritos usando BHK-21.	47
6.6._ El RNA celular no afecta el rendimiento de partículas infecciosas en las transfecciones hechas con RNA de la clona pAVIC.	50
6.7._ El tratamiento con proteasa inhibe la infectividad del RNA extraido de células infectadas.	52
7._ UTILIZACIÓN DE LA CLONA:.....	55
7.1._ Proteína hipotetica sm en el marco de lectura X.	55
7.2._ Análisis teorico de la proteína sm.	58
7.3._ La proteína sm es expresada durante la infección por Astrovirus.	64
7.4._ Análisis de la mutante pAVIC-T ₄₃₇₅ C.	65
8._ CONCLUSIONES:.....	70
9._ PERSPECTIVAS:	72
10._ BIBLIOGRAFÍA:.....	74
11._ ANEXO:	85

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: IMÁGENES DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE ASTROVIRUS	1
FIGURA 2: RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE LA FAMILIA ASTROVIRIDAE	5
FIGURA 3: ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DE HASTV	6
FIGURA 4: TRADUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES	7
FIGURA 5: PROTEÍNA ESTRUCTURAL VP90	9
FIGURA 6: ESTRATEGIA DE REPLICACIÓN DE ASTROVIRUS	11
FIGURA 7: PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA ESTRUCTURAL DE HASTV-8.....	13
FIGURA 8: ENSAYO DE INMUNOPEROXIDASA CON ANTI-HASTV EN CÉLULAS INFECTADAS..	16
FIGURA 9: COMPARACIÓN DE LA INFECTIVIDAD DE HASTV-8 EN CÉLULAS HUH7.5.1 Y HEK-293 CON RESPECTO A CACO-2	29
FIGURA 10: COMPARACIÓN DE RENDIMIENTOS OBTENIDOS EN CÉLULAS HUH7.5.1 Y HEK-293 CON RESPECTO A CACO-2	31
FIGURA 11: EL PROCESAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE ASTROVIRUS EN HUH7.5.1 ES SIMILAR AL OCURRIDO EN CACO-2	33
FIGURA 12: COMPARACIÓN DE RENDIMIENTOS OBTENIDOS EN CÉLULAS CACO-2 Y HUH7.5.1 INFECTADAS A UNA MISMA MOI	35
FIGURA 13: PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA ESTRUCTURAL EN CÉLULAS HUH7.5.1 TRANSFECTADAS CON RNA DE CÉLULAS INFECTADAS	37
FIGURA 14: CÉLULAS HUH7.5.1 TRANSFECTADAS CON RNA VIRAL SON CAPACES DE GENERAR PROGENIE VIRAL	38
FIGURA 15: TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HUH7.5.1 CON DIFERENTES CANTIDADES DE VC-RNA.....	40
FIGURA 16: TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS HUH7.5.1 USANDO DIFERENTES CANTIDADES DE CÉLULAS HUH7.5.1.....	42

FIGURA 17: ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE EL RENDIMIENTO OBTENIDO DE CÉLULAS INFECTADAS POR HASTV-8 Y TRANSFECTADAS CON VC-RNA	44
FIGURA 18: COMPARACIÓN DE LA INFECTIVIDAD DE RNA TRANSCRITO IN VITRO POR DOS DISTINTOS KITS	46
FIGURA 19: LA TRANSFECCIÓN DE LAS CÉLULAS HUH7.5.1 GENERA UNA MAYOR CANTIDAD DE PROGENIE VIRAL QUE CON LOS MÉTODOS YA DESCRITOS PARA BHK-21	49
FIGURA 20: EL RNA CELULAR NO ES DETERMINANTE EN LA INFECTIVIDAD DE RNA VIRAL	51
FIGURA 21: LA INFECTIVIDAD DEL VC-RNA ES DEBIDA A UN FACTOR PROTEICO.....	54
FIGURA 22: VIRUS CON PEQUEÑOS MARCOS DE LECTURA SOBRELAPADOS EN MARCOS DE LECTURA MAYORES	57
FIGURA 23: ALINEAMIENTO DE LAS REGIONES TRADUCIDAS DEL ORFX DE LOS 8 SEROTIPOS HUMANOS	59
FIGURA 24: ESTRUCTURA SECUNDARIA Y GRADO DE DESORDEN PREDICHO PARA LA PROTEÍNA SM DE HASTV-8.....	61
FIGURA 25: LA PROTEÍNA SM ES EXPRESADA EN CÉLULAS CACO-2 INFECTADAS CON HASTV	65
FIGURA 26: GENERACIÓN DE LA MUTANTE DEL ORFX	66
FIGURA 27: LA MUTANTE PAVIC-T ₄₃₇₅ C MUESTRA UN FENOTIPO IGUAL AL WT	67

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: POSIBLES SITIOS DE FOSFORILACIÓN PRESENTES EN LA PROTEÍNA SM DE HASTV-8	63
--	----

RESUMEN

Los astrovirus humanos (HAstV) son causa importante de gastroenteritis. Son virus icosaédricos no envueltos, con un genoma de RNA de polaridad positiva, el cual es infeccioso. De esta manera, se estableció un sistema para generar partículas infecciosas a partir de RNA de una clona de cDNA derivada de HAstV-1 (pAVIC), producido in vitro, que ha resultado poco eficiente porque se utilizaron células no permisibles como empaquetadoras (BHK-21). Para optimizar este sistema en la producción de virus a un ciclo replicativo y evitar la acumulación de mutaciones no deseadas, se probó la permisividad a la infección por astrovirus de líneas celulares humanas altamente transfectables tales como Hek-293 y Huh7.5.1, derivadas de riñón e hígado respectivamente. Debido a que la cinética de infección y el procesamiento de la proteína estructural en Huh7.5.1 resultaron similares a lo producida en células que han sido utilizadas como referencia para HAstV (Caco-2), utilizamos esta línea celular para el rescate de virus. Para estandarizar las condiciones de transfección, se utilizó RNA de células infectadas con HAstV-8. Las mejores condiciones se obtuvieron utilizando 5 µg de RNA, 4×10^6 células y, cosechando entre 12 y 16 horas post-transfección, alcanzando títulos de aproximadamente 10^7 ufc/ml. Al transfectar RNA derivado de la clona pAVIC en estas condiciones, el rendimiento fue 100 veces mayor que aquel obtenido usando los métodos previamente reportados para BHK-21; sin embargo, el rendimiento fue aproximadamente 10 veces menor que aquel obtenido con RNA extraído de células infectadas. Aparentemente, este RNA presenta mayor infectividad debido a modificaciones en el extremo 5', ya que la adición de Cap contribuyó a una mayor infectividad específica. Una vez que se estableció un método eficiente, este se usó para determinar la importancia de la proteína sm traducida a partir del ORFX en la replicación del virus. Mediante el uso de una mutante que elimina el codón de inicio del ORFX, se observó que esta proteína no es esencial para la infección en cultivo celular.

ABSTRACT

Human astroviruses (HAstV) are a cause of gastroenteritis worldwide. They are icosahedral positive ssRNA for which a reverse genetic system using a cDNA clone from HAstV-1 has been established previously. However, this method is somehow inefficient because infectious virus is obtained after several rounds of replication. The main problems are thought to be the low-permissive cell line (BHK-21) that is used as packaging cell, and the time to reach infectious virus, with the possibility that undesirable mutations accumulate. To improve virus yield from the cDNA clone in the shortest period of time possible, additional cell lines were evaluated for transfection efficiency and permissiveness. Human cell lines HEK-293 and Huh7.5.1 showed higher permissiveness than BHK-21, yielding higher viral titers. HAstV infection in Huh7.5.1 was more similar to that in Caco-2 cells (considered as the reference cell line for HAstV replication studies) in terms of the astrovirus yield and protein processing, therefore they were used to standardize the transfection conditions with RNA from infected cells. The highest viral yield was obtained using 5 µg of viral RNA, 4×10^6 cells and harvesting at 16 h. When transcribed RNA in vitro from the HAstV-1 cDNA clone was used, Huh7.5.1 cells yielded infectious virus with titers 2 orders of magnitude higher than BHK-21 cells at 16 h; apparently, addition of the Cap structure to the RNA transcript improved the efficiency of the system. Once we established an efficient method, this was used to determine the relevance of the protein sm translated from the ORFX in the replication cycle. We used a mutant in the start codon of ORFX which abolishes its translation, concluding that this protein is not essential, in cell culture.

ABREVIATURAS.

ANV	Virus de la nefritis aviar (Aviar nephritis virus)
ARCA	Análogo de cap anti reversa (Anti-reverse cap analog)
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
BAstV	Astrovirus bovino (Bovine astrovirus)
BdAstV	Astrovirus de delfín nariz de botella (Bottlenose dolphin astrovirus)
CAstV	Astrovirus de pollo (Chicken astrovirus)
Cc	Coiled-coil
ChAstV	Astrovirus de chita (Cheetah astrovirus)
CMV	Virus del mosaico del pepino (Cucumber mosaic virus)
CslAstV	Astrovirus de león marino de california (California sea lion astrovirus)
DAstV	Astrovirus de pato (Duck astrovirus)
DMEM	Medio dulbeco modificado de Eagle (Dulbecco's Modified. Eagle Medium)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
DNAPK	Proteína cinasa dependiente de DNA (DNA-depended serine/threonine protein kinase)
FAstV	Astrovirus felino (Feline astrovirus)
FHV	Virus de Flock House (Flock house virus)
gRNA	RNA genómico

HAstV	Astrovirus humano (Human astrovirus)
HAstV-VA	Astrovirus humano VA
HCV	Virus de Hepatitis C (Hepatitis C virus)
HEV	Virus de Hepatitis E (Hepatitis E virus)
HMOAstV	Astrovirus humano-hurón-ovino (Human-mink-ovine astrovirus)
ht	Hélice transmembranal
MAstV	Astrovirus de hurón (Mink astrovirus)
Mc-RNA	RNA extraído de células sin infectar
MEM	Medio mínimo esencial (Minimal essential médium)
Moi	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
nsp	Proteína no estructural (Non structural protein)
ORF	Marco abierto de lectura (Open reading frame)
PBS	Búfer de fosfatos salino (Phosphate buffer saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
PEMS	Síndrome de la enteritis mortal del pavo. (poult enteritis and mortality síndrome)
PIPES	Ácido piperacín-N,N'bis-2-etanosulfónico (Piperazine-N,N'-bis-2-ethanesulfonic acid)
PKA	Proteína cinasa A (Protein kinase A)
PKC	Proteína cinasa C (Protein kinase C)
PKG	Proteína cinasa G (Protein kinase G)

PoAstV	Astrovirus porcino (Porcine Astrovirus)
RNA	Acido ribonucleico (Ribonucleic acid)
RSK	Cinasa ribosomal de S6 (Ribosomal s6 kinase)
RT	Transcripción reversa seguida de reacción en cadena de polimerasa (Reverse transcription-Polymerase chain reaction)
SDS	Dodecil sulfato de sodio (Sodium dodecyl sulfate)
sgRNA	RNA subgenómico
SslAstV	Astrovirus de león marino de Steller (Steller sea lion Astrovirus)
TAE	Tris-acetato-EDTA
Tamb	Temperatura ambiente
TAstV	Astrovirus de pavo (Turkey astrovirus)
Vc-RNA	RNA extraído de células Caco-2 infectadas con HAstV-8
Vc-RNA/RNAsa	RNA extraído de células Caco-2 infectadas con HAstV-8 tratado con RNAsa
VP	Proteína viral (Viral protein)
V-pro	Proteasa viral

1._INTRODUCCIÓN:

1.1._ Generalidades.

Los miembros de la familia *Astroviridae* son virus con una estructura icosaédrica y apariencia de estrella con 5 a 6 puntas, cuando son observados al microscopio electrónico (Fig. 1). Su tamaño es de aproximadamente 40 nm (incluyendo las espículas). Son virus que carecen de membrana, y están formados por una capa proteica, conformada por un solo tipo de proteína, que envuelve un genoma de cadena sencilla de RNA de polaridad positiva.

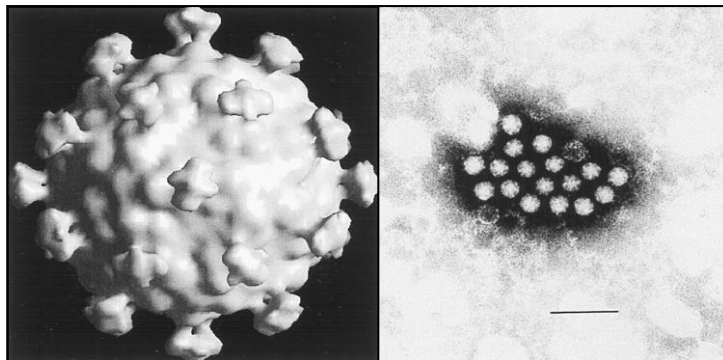


Figura 1: Imágenes de microscopía electrónica de astrovirus Izquierda: Representación en tres dimensiones de HAstV-1 resultado del análisis estructural por criomicroscopía electrónica. Derecha: Microscopía electrónica de HAstV a partir de muestras fecales (58).

Los astrovirus se han identificado en una gran variedad de especies de mamíferos (género *Mamastovirus*) y aves (género *Avastovirus*) incluyendo humanos (HAstV), bovinos (BAstV), cerdos (PoAstV), hurones (MAstV), gatos (FAstV), ratones, ratas, venados, pollos (CAstV), pavos (TAstV), chitas (ChAstV) y, recientemente, se han descrito infecciones en murciélagos (16) y mamíferos marinos como el león marino de California

(CslAstV), león marino de Steller (SslAstV), y delfín nariz de botella (BdAstV) (69). En animales como cerdos y rumiantes, los astrovirus se han asociado a casos de diarrea crónica. En aves es causa de enfermedades tanto intestinales como no intestinales que van desde diarreas leves hasta enfermedades graves como hepatitis en patos (73) y el síndrome de enteritis mortal del pavo (PEMS) (82). La infección en pollos causada por el virus de la nefritis aviar (ANV) se ha asociado a un retraso del crecimiento y nefritis intersticial aguda afectando gravemente la economía del sector avícola (46). En hurones, mediante estudios de metagenómica viral, recientemente se detectó a astrovirus como agente causal del síndrome del hurón tembloroso (“shaking mink syndrome”); siendo uno de los primeros estudios en detectarlo en el sistema nervioso central de mamíferos (11). Se han analizado astrovirus encontrados en muestras tomadas de murciélagos insectívoros de cuevas en Hong Kong, los que se han clasificado en los subtipos A y B tomando como referencia la secuencia que codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA. Sorpresivamente, 5 secuencias de astrovirus de murciélago no caen en esta clasificación, sino que se relacionan en mayor medida con los serotipos humanos que con los animales encontrados en la zona de donde fueron recolectados. Dado que los murciélagos se han mostrado como reservorios de otros virus que pueden afectar al ser humano como el ebola y la rabia, no se descarta la posibilidad de un caso similar para astrovirus (16).

Los astrovirus humanos (HAstV) son reconocidos como una de las principales causas de gastroenteritis viral en el mundo, principalmente en niños pequeños (17). También se han reportado brotes esporádicos dentro de instituciones geriátricas (48) y cuarteles militares (9); así mismo de ha sugerido como causa de diarrea crónica en pacientes inmunocomprometidos (24). En muestras de tejido cerebral astrovirus fue

identificado como posible agente causal de encefalitis en un paciente con agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, lo cual es el primer caso reportado en humanos donde la infección no es en el aparato digestivo (66). En general, la diarrea causada por la infección con astrovirus es menos severa que la provocada por rotavirus y no lleva a una deshidratación severa que requiera hospitalización, por lo que raramente es causa de infecciones fatales; sin embargo, se han reportado en infecciones persistentes (75). La edad en la que se es más propenso a sufrir infecciones por astrovirus depende de las características de la zona donde se lleve a cabo el estudio; por ejemplo, en un estudio realizado en España, aproximadamente el 80% de las infecciones por astrovirus se presentaron en niños menores de 3 años, mientras que en estudios en Egipto el 74% de los casos fueron en niños menores de 12 meses (36, 64).

Entre los HAstV, se han identificado 8 serotipos por medio de inmunofluorescencia, ensayos de neutralización e inmunomicroscopía electrónica. A pesar de las diferencias, todos los HAstV comparten epítopes comunes dentro de la región amino-terminal de la proteína de la cápside, lo cual se ha utilizado con fines diagnósticos. Debido a que los sueros serotipo-específico son reactivos limitados, actualmente se ha utilizado la secuenciación de su genoma, especialmente en la región correspondiente al carboxilo terminal de la proteína estructural, para agrupar estos virus en genotipos, lo que ha correlacionado con la agrupación con base a la reactividad con sueros (58).

En general, el serotipo 1 de HAstV es el más frecuentemente encontrado en muestras obtenidas de niños enfermos, sin embargo, el serotipo predominante varía de acuerdo a la región (58, 62). En un estudio realizado con muestras tomadas de niños mexicanos con diarrea, el serotipo 2 fue el prevalente (33). En el campo de la investigación,

los mayores avances en el conocimiento de su biología se han logrado estudiando cepas de serotipos 1 (HAstV-1) y 8 (HAstV-8).

Recientemente se han descrito nuevas especies de astrovirus humano. En muestras recuperadas de heces de un niño de 3 años con diarrea en Australia, fue encontrada la especie denominada astrovirus MLB1 en la cual las regiones no traducidas 5' y 3', altamente conservadas en los genomas de otros astrovirus humanos, son diferentes (21). Por otra parte, la especie conocida como astrovirus HMO, que incluye tres variantes A, B y C, fueron encontrados en muestras de heces de casos de gastroenteritis en Nepal, Pakistán y Nigeria. Al realizar el análisis filogenético en base a las regiones correspondiente a la cápside y a la RNA polimerasa viral, estos astrovirus estuvieron muy relacionados con especies de Mamastrovirus que infectan hurones y ovinos, por lo que se les dio el nombre de Human-mink-ovine Astrovirus (42). La cepa de astrovirus denominado AstV-VA1 fue aislada de muestras de pacientes con gastroenteritis en el este de Virginia. El genoma de este virus se secuenció y se hicieron estudios de filogenia usando los tres marcos abiertos de lectura (ver más adelante), mostrando alta divergencia de esta cepa con otros astrovirus humanos y animales (22). Recientemente, se han encontrado cepas de astrovirus que tienen una mayor grado de identidad con las cepas AstV-VA1 y MLB1 las cuales fueron llamados AstV-VA2, AstV-VA3 y MLB2 (20).

Por otra parte, se ha establecido una nueva clasificación donde se incluyen todos los astrovirus recientemente descritos. Esta clasificación se basa en la relación filogenética de la secuencia de nucleótidos completa del ORF2 entre las diferentes cepas detectadas de astrovirus (12). Así los Mamastrovirus y Avastrovirus se han dividido en genogrupos. De

esta forma se incluyeron los grupos Avastrovirus GI y GIIA, además de los Mamastrovirus GI y GII (Fig. 2).

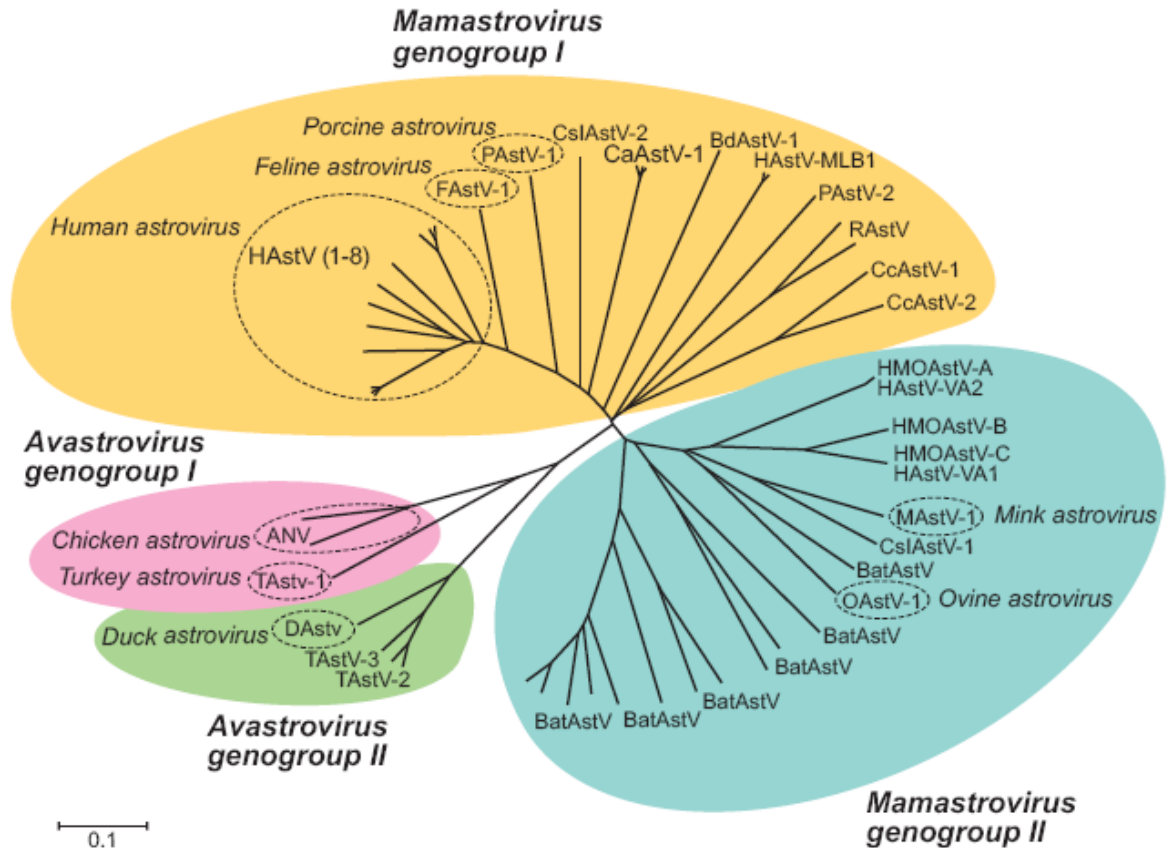


Figura 2: Relaciones filogenéticas entre la familia Astroviridae. Se puede observar la clasificación actual de astrovirus en genogrupos y las cepas que los conforman. Este análisis se llevo a cabo en base a la secuencia de nucleótidos del ORF2 (12).

1.2._ Organización del genoma y poliproteínas.

El genoma de HAsV es de aproximadamente 6.8 kb. Durante la infección, se han detectado 2 especies de RNA de polaridad positiva: el RNA genómico (gRNA) y un RNA

de 2.4 kb, que se ha denominado RNA subgenómico (sgRNA), y que es colinear con el extremo 3' del genoma (Fig. 3). El RNA genómico, por ser de polaridad positiva, funciona como mRNA y por lo tanto puede ser infeccioso, es decir, es capaz de iniciar una infección y producir progenie viral (58).

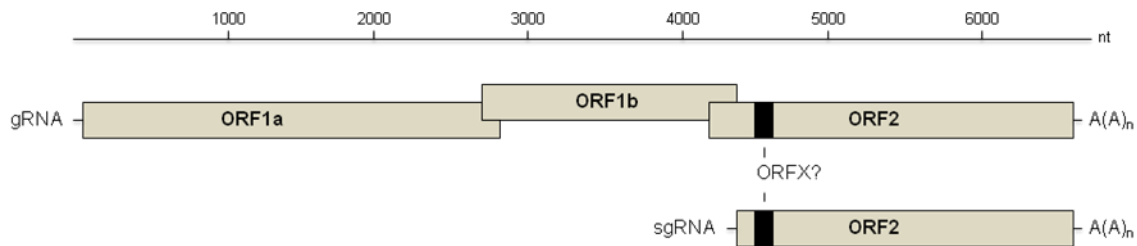


Figura 3: Organización del genoma de HAstV. Se observa la localización de los tres ORFs en el genoma, así como las regiones no traducidas 5' y 3' con una cola de poli A. En la parte inferior se representa la región que corresponde al RNA subgenómico (58). En recuadro negro se marca la localización de un pequeño ORF alternativo (ORFX) dentro del ORF2 (23).

El genoma está organizado en tres marcos abiertos de lectura denominados ORF1a, ORF1b y ORF2, con regiones no traducidas 5' y 3' de aproximadamente 80 nucleótidos, así como una secuencia de poli A en el extremo 3' (Fig. 3). Recientemente se ha descrito la presencia de un pequeño marco abierto de lectura alternativo que sobrelapa al ORF2 en posición +1, el cual fue denominado ORFX (23). A pesar de que el ORFX se encuentra conservado en todos los HAstV, no se sabe si se traduce durante la infección y si la proteína pudiera ser funcional. El ORF1a codifica para la proteína no estructural nsp1a, que tiene 5 o 6 motivos de hélices transmembranales, seguidos por un motivo proteasa de serina (40) el cual tiene características consistentes con proteasas parecidas a quimotripsina de otros virus de RNA de polaridad positiva. Esta proteína tiene dos motivos de estructura coiled-coil y

una pequeña región altamente variable, la cual se piensa que es importante para la adaptación del virus a diferentes líneas celulares. En base a la similitud de la secuencia de HAstV con calicivirus, se ha sugerido que la región que se encuentra entre el aminoácido 664 al 804 de nsp1 podría ser la proteína viral de unida al genoma (VPg) de Astrovirus (Fig. 4). En analogía con otros virus de cadena sencilla y de polaridad positiva, esta proteína podría tener participar en la replicación o traducción del genoma (3). Por su parte, el ORF1b contiene un motivo de RNA polimerasa dependiente de RNA (81). La traducción de estos dos ORFs genera las proteínas no estructurales nsp1a (ORF1a) y nsp1b, esta última como parte de la poliproteína nsp1ab (ORF1a y ORF1b) resultando de un cambio de fase durante la traducción (Fig. 4).

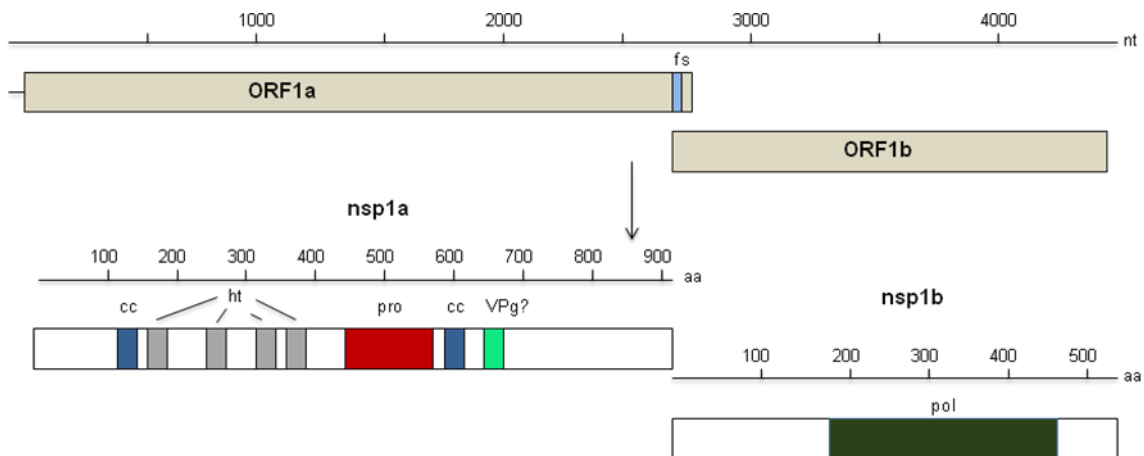


Figura 4: Traducción de las proteínas no estructurales. Los cuadros grises representan las regiones del genoma ORF1a y ORF1b a partir de las cuales se traducen las proteínas no-estructurales nsp1a y nsp1ab respectivamente (cuadros blancos). Se encuentran representados las regiones de la proteína que corresponden a los motivos de hélices transmembranales (ht), proteasa (pro), posible VPg (VPg?), cambio de lectura (fs), estructuras coiled-coil (cc) y la RNA polimerasa dependiente de RNA (pol) (58).

Por otro lado, el ORF2, localizado hacia el extremo 3', es común entre el gRNA y el sgRNA, y codifica para la proteína de la cápside (Fig. 3) (63). Se ha sugerido, con base al análisis de la secuencia corriente arriba del ORF2, que los nucleótidos de esta región podrían formar parte del promotor para la síntesis del sgRNA, incluyendo una secuencia del ORF2 donde se encuentra el codón de inicio AUG (78). El alineamiento de aminoácidos de la proteína de la cápside entre los diferentes serotipos de HAstV indica un alto grado de conservación de los 415 aminoácidos hacia el amino terminal (55), con dos pequeñas regiones hipervariables en esta región. El carácter básico en los primeros 70 aminoácidos en la región amino terminal de la proteína se encuentra altamente conservado. Se piensa que esta región está involucrada en el reconocimiento del RNA viral durante el ensamblado de partículas (28). En la segunda mitad hacia el extremo carboxilo a partir del aminoácido 416, se encuentra una región delimitada con inserciones y deleciones (79), la cual forma las espículas del virión y podría participar en interacciones tempranas con el receptor de la célula hospedera (45). El carácter ácido de una pequeña región en el carboxilo terminal de la proteína de la cápside, entre los residuos 649 a 702 para HAst-8, también se encuentra altamente conservado; esta región es importante para el procesamiento intracelular de la proteína ya que en él se encuentran varios sitios de corte por proteasas celulares, los cuales son importantes para la salida del virus (Fig. 5).

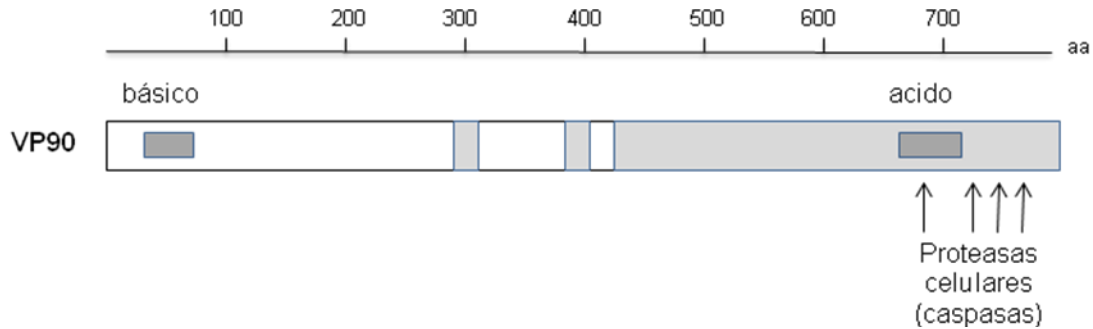


Figura 5: Proteína estructural VP90. La proteína VP90 es traducida a partir del ORF2 de astrovirus. Las regiones altamente conservadas entre los serotipos de HAstV se encuentran en color blanco, mientras que las regiones hipervariables de la proteína están marcadas en color gris claro. Se muestran los sitios de procesamiento por caspasas y las regiones de carácter básico y ácido altamente conservadas

1.3._ Ciclo replicativo.

La entrada del virus a la célula ocurre por endocitosis mediada por clatrina, aunque se desconoce el receptor celular para el virus. Tampoco se conocen los dominios de la proteína de la cápside involucrados en la unión, la entrada y el desnudamiento del virus para liberar el RNA viral en la célula. Gracias a la cristalización de la proteína que forma las espículas virales se han predicho las regiones denominadas P y S además de un giro β , los cuales por su posición en la proteína y el grado de conservación de aminoácidos polares podrían participar en la interacción con el receptor (18). Debido a la composición de la región P con respecto a residuos polares y su comparación con otras proteínas de unión al receptor de otros virus, se propuso que posiblemente un azúcar sea el receptor reconocido por HAstV durante su entrada a la célula (18). Una vez que el virus entra a la célula, el RNA es liberado y usado como templado para traducir las proteínas no estructurales, es decir, aquellas que no forman parte del virus y que participan tanto en la replicación como

en la transcripción de su genoma. Para llevar a cabo su función, estas proteínas se deben procesar proteolíticamente, principalmente por la proteasa viral contenida en nsp1a, sin embargo, poco se conoce del mecanismo por el que se procesan y los sitios de corte que reconoce esta enzima. En ensayos de actividad in vitro, se encontró que la proteasa es capaz de cortar sólo en el N terminal de los aminoácidos ácido aspártico (Asp) y glutámico (Glu) cargados negativamente en su cadena lateral (72). En base a ello, se han propuesto varios sitios posibles de corte por la proteasa viral (26, 43), sin embargo, de todos ellos sólo el aminoácido Glu654, es donde podría llevarse a cabo el corte sin alterar la actividad de la proteasa. Utilizando diferentes anticuerpos, se han detectado proteínas de 57kDa, 20kDa, 19kDa así como dos de 27kDa como resultado final del procesamiento proteolítico de las proteínas no estructurales además de intermediarios de 88kDa, 75kDa, 20kDa, 145kDa y 85kDa que son resultado del procesamiento parcial de estas. Por otro lado, la proteína nsp1a es procesada por proteasas celulares para dar un fragmento de 20 kDa que contiene el amino terminal (61). Al igual que con todos los virus de RNA de polaridad positiva, se cree que la actividad de la proteasa viral es esencial para la replicación del virus. Estas proteínas se utilizan para la síntesis de una molécula de RNA de polaridad negativa del mismo tamaño que el gRNA, a partir del cual, a su vez se generan el gRNA y el sgRNA. Finalmente, éstos se utilizan nuevamente como moldes para sintetizar las proteínas correspondientes (Fig. 6).

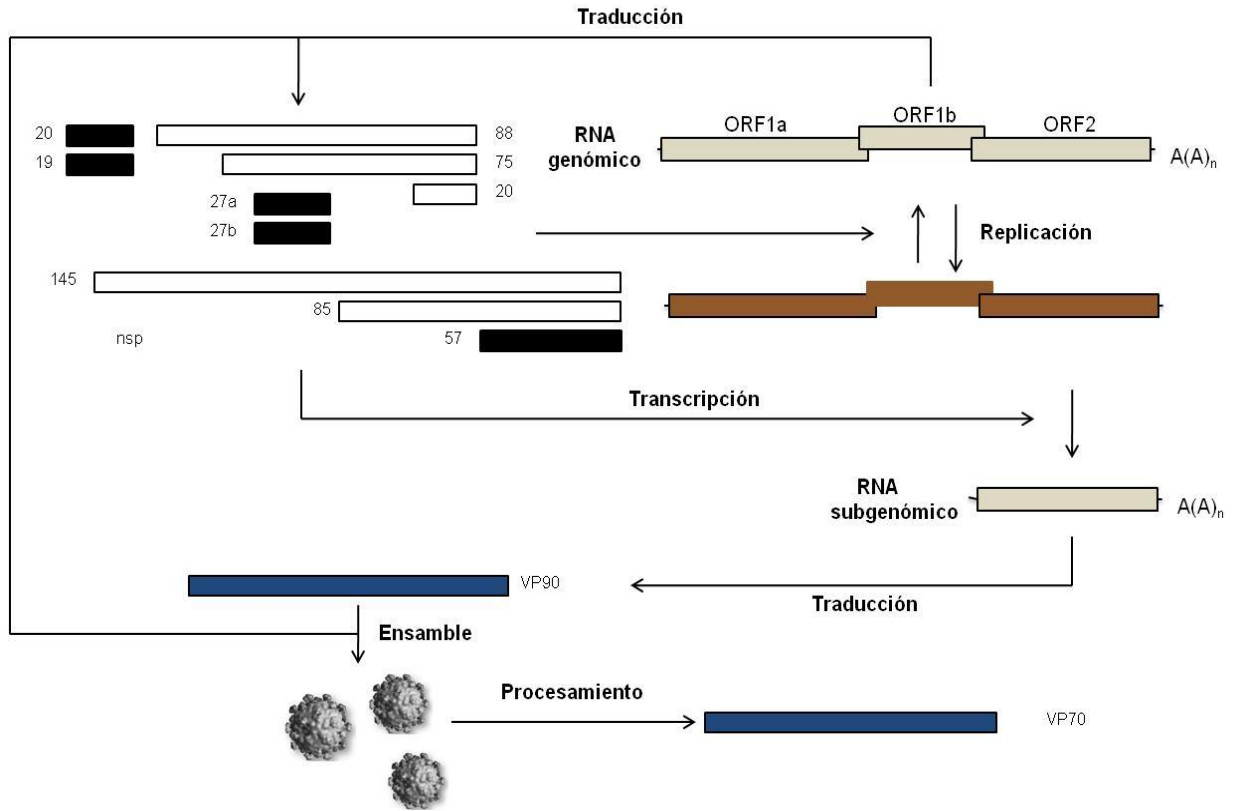


Figura 6: Estrategia de replicación de astrovirus. El RNA genómico (gRNA) una vez que entra a la célula es usado como mRNA para traducir las proteínas no estructurales (nsp). Estas sufren un procesamiento por proteasas celulares y la proteasa viral dando productos intermedios (barras blancas) que generaran los productos finales de 20, 19, 27 y 57kDa (barras negras). Las proteínas nsp, a su vez, participan en la replicación del gRNA, así como en la generación del RNA subgenómico (sgRNA) a través de un gRNA de polaridad negativa (barras café). El sgRNA es traducido generando la proteína de la cápside de 90kDa (VP90) que junto al genoma se ensambla en partículas virales. VP90 es procesada por caspasas a una proteína de 70kDa (VP70) (barras azules) necesaria para la salida del virus (58).

La proteína de la cápside de 87 a 90kDa, denominada VP90 en HAstV-8, se sintetiza a partir del sgRNA. Esta proteína sufre varios cortes proteolíticos que se han asociado con diferentes funciones a lo largo del ciclo de replicación viral. Los cortes proteolíticos que ocurren de manera intracelular son mediados por enzimas proteolíticas importantes en la muerte celular por apoptosis, denominadas caspasas. Existen varios sitios susceptibles a las caspasas en VP90, y todos parecen ser funcionales, aunque el resultado

final es una proteína de 70kDa (VP70) (Fig. 7). Es importante mencionar que este procesamiento se lleva a cabo una vez que VP90 se ensambla en partículas. Hay que considerar que la proteína VP90 se encuentra en asociación con membranas dentro de las células, por lo que es posible que el ensamble de las partículas se lleve a cabo en asociación a estas ya que también se encontró colocalización de las proteínas no estructurales y del RNA viral. Asimismo, se ha propuesto que el ensamblaje de partículas se lleve a cabo en membranas derivadas de retículo endoplásmico, en analogía con otros virus (57). La liberación de las partículas virales parece depender del corte, porque solamente las partículas que contienen VP70 se encuentran en el medio extracelular (5, 59). Recientemente se encontró que las caspasas iniciadoras Casp-8 y Casp-9 parecen estar involucradas en la activación de las caspasas ejecutoras y al parecer las caspasas 3 y 9 parecen estar involucradas en el procesamiento directo de VP90 (5). Sin embargo, no se conoce la importancia funcional de los sitios susceptibles a caspasas en este proceso, ni los factores celulares que están involucrados en el corte de VP90 y en la liberación del virus.

Por otro lado, a través de un mecanismo complejo y secuencial, el tratamiento con tripsina del virus liberado, genera al menos 6 cortes sobre la proteína VP70. Inicialmente se producen polipéptidos de 41 y 28kDa los cuales son cortados de manera secuencial para dar como resultado final tres proteínas de 34, 27 y 25kDa, así como partículas con alta infectividad (59) (Fig. 7). Debido a que este procesamiento es secuencial, no se conoce la importancia de cada uno de los sitios reconocidos por la proteasa, ni si existe alguno de ellos que sea determinante en la generación de las partículas con alta infectividad. Este procesamiento parece ser esencial en la infección del virus a su célula huésped, sin

embargo, no se sabe a qué nivel se favorece la infección por este corte, si a nivel de unión, entrada o desencapsidación de las partículas virales (57).

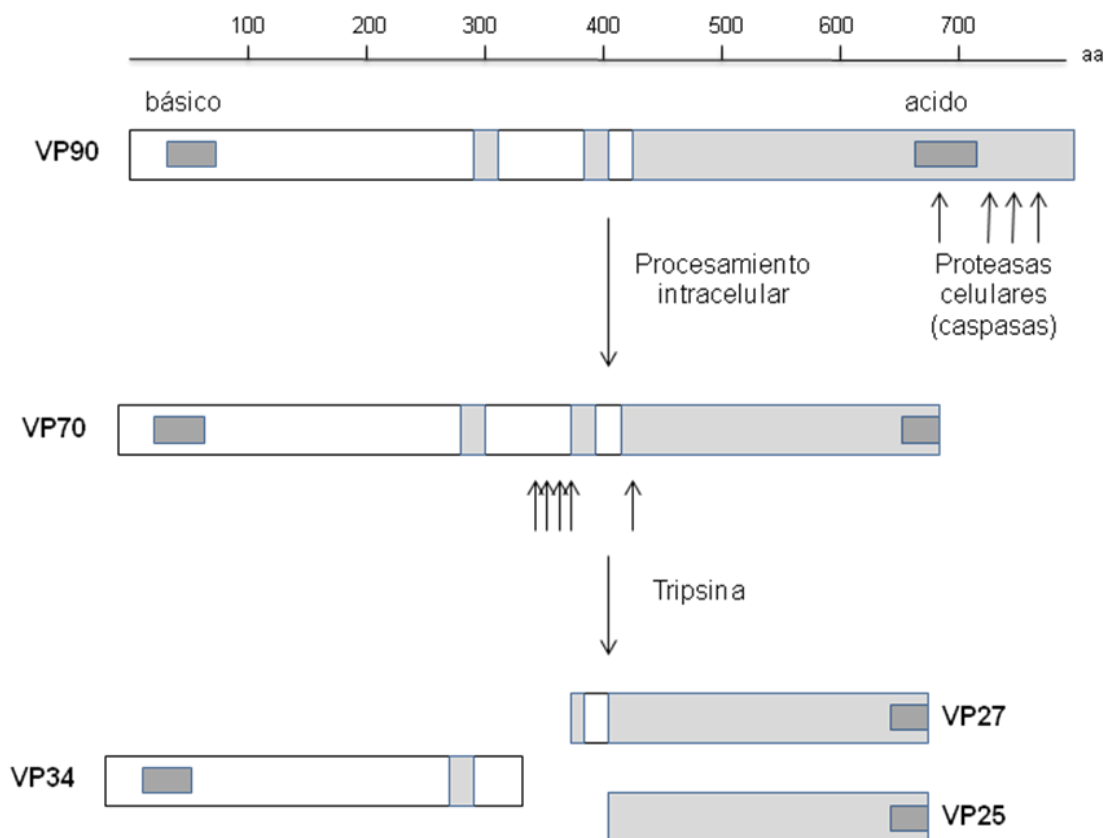


Figura 7: Procesamiento de la proteína estructural de HAstV-8. El rectángulo superior representa el producto de traducción de ORF2 VP90. La secuencia de aminoácidos conservada está indicada por las cajas blancas y las cajas grises representan la región hipervariable. Están indicadas las regiones básicas y ácidas altamente conservadas en HAstV. Las flechas en VP90 indican los sitios propuestos para el corte con caspasas. El procesamiento de VP90 da origen a VP70 en donde están marcados con flechas la localización de los sitios de corte con tripsina. Los rectángulos inferiores representan los productos finales del corte con tripsina (58).

2. Antecedentes:

Existen muchas incógnitas acerca del ciclo de replicación de los astrovirus, algunas de las cuales se han mencionado anteriormente. Una estrategia que ha sido clave para contestar estas preguntas en otros sistemas ha sido a través de genética reversa que, en el caso de HAstV, este enfoque es posible por el hecho de que el genoma de astrovirus es infeccioso. De esta manera, se desarrolló un sistema para HAstV-1 en el cual, el genoma de HAstV está clonado bajo el control del promotor de la RNA polimerasa del fago T7 y flanqueado por el sitio único de corte para la enzima XhoI, de manera que, por transcripción *in vitro* se puede generar una molécula de RNA que representa al gRNA viral completo. Al transfectar este RNA en células, se pueden generar partículas infecciosas. El problema con este sistema es que resulta muy poco eficiente porque las células que se han utilizado, aunque altamente transfectables (células BHK-21, de riñón de hámster), no son susceptibles y son poco permisivas a la infección por astrovirus (13). Por lo anterior, el rendimiento de partículas infecciosas es demasiado bajo para ser detectado, aunque la cosecha de este se realice a tiempos largos (48 horas) post-transfección. Además, en este sistema existe la necesidad de amplificar el virus en células Caco-2, que son susceptibles, realizando pases adicionales. Esto ha ocasionado que al utilizar este sistema se hayan seleccionado mutaciones adicionales a las introducidas, con lo cual no se ha conseguido analizar el fenotipo de las mutaciones originales de forma confiable (34). Por el contrario, las células Caco-2 usadas para crecer el virus debido a su permisividad a la infección (13), no se transfectan eficientemente como para usarlas directamente en el método de genética reversa.

Con anterioridad, Brinker et al. en el 2000 evaluó la susceptibilidad de una gran variedad de líneas celulares a la infección por HAstV utilizando los serotipos 1 al 7 (13). De entre todas ellas las células Hek-293 fueron susceptibles a todos los serotipos probados. Además estas células son conocidas por su gran transfectabilidad, por lo que pueden ser un buen candidato para sustituir a las células BHK-21 en el método de genética reversa. Recientemente, en nuestro laboratorio se ha valorado la susceptibilidad de diferentes líneas celulares a los astrovirus (56), utilizando una cepa de HAstV-8. En estas circunstancias, se observó que la línea celular derivada de hepatocarcinoma humano, Huh7.5.1, es susceptible al virus, por lo que pensamos que podríamos obtener mayor rendimiento de virus con respecto al obtenido en células BHK-21, haciendo el sistema de genética reversa más eficiente, especialmente si se considera que esta línea celular ha demostrado ser altamente transfectable con RNA (Fig. 8). Estas características podrían también favorecer la obtención de partículas infecciosas a un ciclo de replicación, evitando la acumulación de mutaciones adicionales en la progenie viral (70).

Una vez que se haya generado esta herramienta, se podrá hacer uso de ella para generar partículas que contengan mutaciones sobre regiones de interés. En el caso de astrovirus, nuestro laboratorio ha generado datos que nos han llevado a formular preguntas que pudieran resolverse usando un sistema como el que se desea establecer. Por ejemplo, se ha determinado la estructura de las proteínas que forman la espículas del virión y gracias a esto, se ha sugerido una región que pudiese participar en la interacción con el receptor celular (18), lo cual se podría llegar a comprobar realizando deleciones en estas zonas con partículas generadas de la clona. Además, se han determinado los sitios de corte por caspasa dentro de la proteína estructural, los cuales se han relacionado con la salida de las

partículas virales de la célula infectada (60); realizando cambios en estos sitios se podría llegar a comprender con mayor detalle el proceso que sigue el virus para salir de las células. Aun más, los usos se pueden extender al estudio de otros virus relacionados; se reportado que la proteína estructural de astrovirus comparte una gran similitud con la del virus hepatitis E (HEV) (18), debido a esto, podría ser factible la generación de un sistema donde pueda utilizarse una quimera de astrovirus para el estudio de HEV.

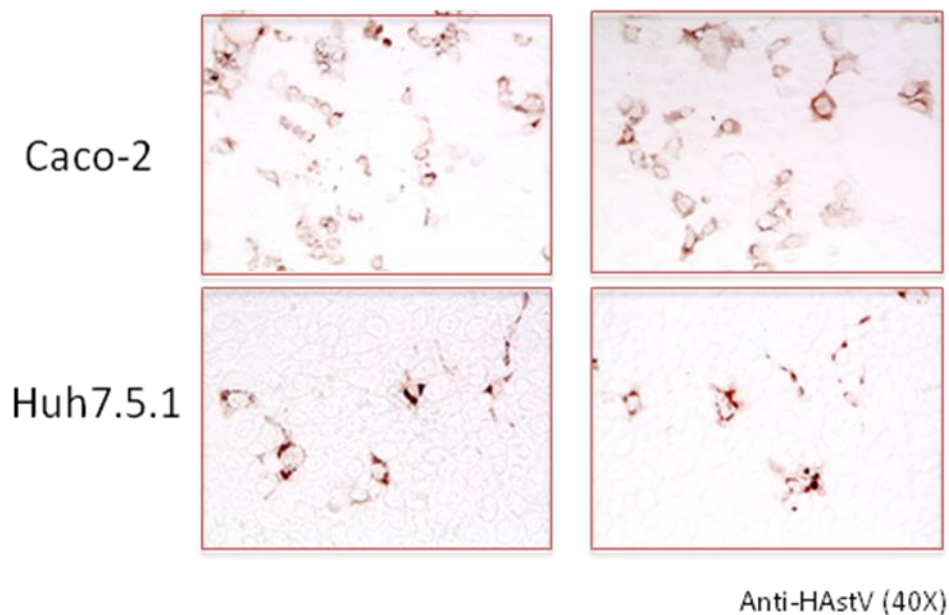


Figura 8: Ensayo de inmunoperoxidasa con anti-HAstV en células infectadas. Se muestran células Caco-2 y Huh7.5.1 infectadas con HAstV-8 y teñidas por inmunoperoxidasa (56).

Las células Huh7.5.1 fueron obtenidas a partir de la línea Huh7.5 la cual fue persistentemente infectada con el virus de hepatitis C y tratada con interferón γ , generando un fenotipo no infeccioso estable (70, 77). Las células Huh7.5 fueron derivadas de las

células Huh7 y presentan una mutación puntual en el gene-I inducible por ácido retinoico (RIG-I). La activación de RIG-I por RNA de doble cadena resulta en la fosforilación y migración al núcleo del factor de regulación de interferón 3 (IRF-3), activando la respuesta antiviral. Esto sumado a la baja expresión de los receptores parecidos a Toll en las células Huh7 dan como resultado una baja respuesta a interferón de tipo I en las células Huh7.5.1 (6). Como la producción de interferones de tipo I α (INF α) y β (INF β), así como la subsecuente expresión de los genes estimulados por IFN, son el centro de la respuesta antiviral de la célula (68) pensamos que se pudiera favorecer la generación de partículas virales al usar estas células para transfectar RNA viral.

Pensamos que el uso de estas células y la optimización de las condiciones de transcripción/transfección de RNA de astrovirus en ellas podría ser útil para generar un sistema eficiente de genética reversa. Este sistema seguramente será una poderosa herramienta para el estudio de diversos aspectos en la biología de los astrovirus, incluyendo aquellos relacionados con su entrada a la célula huésped y de morfogénesis, que conducen a su liberación.

3._ HIPÓTESIS:

La optimización de un método eficiente de genética reversa para astrovirus utilizando células permisibles nos permitirá estudiar diversos aspectos del ciclo replicativo de Astrovirus.

4._ OBJETIVOS:

General: Optimizar un método de genética reversa para astrovirus utilizando líneas celulares permisibles a la infección.

4.1._ Objetivos Particulares:

- Identificar líneas celulares permisivas a la infección por HAstV, con alta capacidad de transfección.
- Optimizar el método de transfección para la línea celular permisiva y transfectable comparándolo con aquellos anteriormente descritos.
- Utilizar la clona de HAstV-1 para estudiar la función de regiones importantes en el ciclo replicativo del genoma, específicamente el posible papel de la proteína traducida a partir del ORFX.

5._ MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1._ Células.

En este trabajo fueron usadas las líneas celulares derivadas de Adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) y de riñón de hámster bebé (BHK-21) las cuales, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). La línea celular derivada de hepatocarcinoma humano Huh7.5.1 fue generosamente donada por la Dr. K Kirkegard de la Universidad de Stanford en EUA. Las células Hek-293 fueron donadas por la Dr. S. Castro del Instituto de Biotecnología, Cuernavaca Morelos, Mexico. Todas las líneas celulares usadas en este trabajo se cultivaron en monocapa, bajo una atmósfera de 10% de CO₂ a 37°C con medio Dulbecco Modificado de sales de Eagle con alta glucosa (DMEM-HG) (Sigma Cat. D777) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Cansera), aminoácidos no esenciales (Gibco Cat. 1140) y soluciones tampón (Bicarbonato de sodio y HEPES). Las células fueron subcultivadas tras formar una monocapa confluyente mediante tripsinización y sembradas con una relación 1:4. Las células volvieron a formar una monocapa confluyente tras 3 a 4 días de incubación.

5.2._ Virus.

Se utilizó la cepa de astrovirus humano serotipo 8 (55) denominada Yuc8 adaptada previamente para crecer en células Caco-2. Los stocks fueron preparados como se ha

descrito anteriormente (59). Para la propagación del virus se utilizó una multiplicidad de infección (moi) de 0.1. Las células después de formar una monocapa confluyente se lavaron 2 veces con Medio Mínimo Esencial (MEM) (Thermo scientific Cat. SH30327.01) con bicarbonato y sin suero fetal bovino. Posteriormente, se inocularon con astrovirus HAstV-8 previamente activado por el tratamiento con 200µg/ml de tripsina (Gibco Cat.27250-18) durante 1 hora a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y se agregaron 200µg/ml de inhibidor de tripsina de soya (Sigma Cat. T-9003). Se incubaron una hora a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ para permitir la adsorción del virus a las células. Luego de este tiempo se retiró el inóculo, se agregó medio MEM fresco y se incubó a 37°C a 10% de CO₂. Tras 20 horas de incubación se cosechó el virus.

5.3. _ *Suero y Reactivos.*

El suero policlonal de conejo contra la proteína de la cápside y contra la proteasa viral (V-pro) de HAstV-8 fueron descritos previamente (59, 61). Los anticuerpos de suero policlonal de conejo dirigidos contra HAstV-1 cepa Oxford fueron generados usando virus purificado (7). Anticuerpos de suero policlonal de cabra anti-conejo acoplados a Alexa-488 (Molecular Probes Cat. 11034), y proteína A acoplada a peróxidasa de rabano (Amersham Cat.NA-9120-V) fueron usados como anticuerpos secundarios para detectar células infectadas.

5.4. Titulación Viral.

Se sembraron células Caco-2 o Huh7.5.1 en cajas de 96 pozos y se infectaron como se describió antes, realizando diluciones de los diferentes lisados que contenían el virus. Para HAstV-8, la titulación se llevó a cabo por tinción de inmunoperoxidasa. Después de 18 horas, se fijaron las células con metanol por 15 minutos y se lavaron 2 veces con PBS (0.08% NaCl, 0.02% KCl, 0.115% Na₂HPO₄; pH 7.4). Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo policlonal anti-HAstV-8 dirigido contra la proteína de la cápside y para la detección se utilizó proteína A peroxidasa. Después de agregar el anticuerpo primario o secundario al cultivo celular, se incubó 2 horas a 37°C y después de ese tiempo se lavó 2 veces con PBS. Al final se agregó el sustrato de peroxidasa (1.5ml de Carbazol 4mg/ml en dimetilformamida, 4ml de buffer de acetatos y 20ml de peróxido) para detectar las células infectadas.

En el caso de HAstV-1, la titulación se llevó a cabo por tinción por inmunofluorescencia. Fueron sembradas células Caco-2 en cajas de 48 pozos sobre cubreobjetos y una vez formada una monocapa confluyente, se infectaron como se describió anteriormente. Después de 18 horas de incubación, se retiró el medio, se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron usando para-formaldehído al 2% por 15min a temperatura ambiente (Tamb). Posteriormente, se lavaron 4 veces con PBS 50mM de NH₄Cl y se permeabilizaron usando TritonX100 al 0.5% en PBS-BSA 1%-50mM NH₄Cl por 15min a Tamb. Después se bloqueó con PBS-BSA 1%-NH₄Cl 50mM 1hr a Tamb. Como anticuerpo primario se utilizó antiHAstV-1 dirigido contra la proteína de la cápside y, como anticuerpo secundario, anti

conejo acoplado a Alexa488. Cada anticuerpo fue incubado 1hr a Tamb. Las células infectadas fueron visualizadas usando un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioscope 2 mot plus) equipado con cámara (Photometrics CoolSnap HQ).

5.5._ Cinética de Infección.

Inicialmente, se sembraron las células Huh7.5.1 y Caco-2 en cajas de 12 pozos. Se infectaron las células con HAstV-8 como se describió anteriormente pero en este caso se tomaron muestras de sobrenadante y de la fracción celular de la cual se analizó título viral y proteínas por western blot a las 6, 10, 12, 16 y 20 horas. Las muestras de células se congelaron y descongelaron para lisarlas y junto con el sobrenadante se titularon de la forma en que esta anteriormente descrita. Se tomaron muestras de la fracción celular a diferentes tiempos lisando las células con buffer de lisis (SDS 0.5%, Tris 50mM, NaCl 0.15M) para análisis de proteínas.

5.6._ Extracción de RNA

Se extrajo el RNA a partir del lisado de células Caco-2 infectadas con HAstV-8 usando una multiplicidad de infección (moi) de 0.1. Las células se lavaron 2 veces con PBS a las 18 horas y se homogenizaron con Trizol (Invitrogen Cat. 15596-018) (1ml por 10cm² de células). Luego se agregaron 0.1ml de cloroformo por cada mililitro de Trizol agitando vigorosamente, se centrifugaron a 14000 rpm 5 minutos a 4°C y la fase acuosa se tomó al terminar. A continuación, se precipitó el RNA utilizando 0.5 ml de isopropanol por

mililitro de Trizol utilizado y se centrifugó a 14000 rpm 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se realizó un lavado utilizando etanol frío. Finalmente, se disolvió el RNA en agua libre de RNAsas. Para usar como control se extrajo además RNA de células Caco-2 sin infectar. Cuando se indica en el texto, antes de usar el RNA total, este fue tratado con proteinasa K (concentración final de 2µg/µl) (Invitrogen Cat. 25530-049) por 30 min a 37°C.

5.7._ *Transcripción in vitro a partir de la clona pAVIC.*

El plásmido pAVIC, que contiene el genoma completo de Astrovirus Humano serotipo 1 cepa Oxford, y pAVICT₄₃₇₅C el cual tiene una mutación en el codón de inicio del ORF3, fueron donados por la Dr Suzanne Matsui y Ute Geigenmuller de la Universidad de Stanford, EUA. Para linealizar los plásmidos estos fueron digeridos con la enzima XhoI (New-England Biolabs). El plásmido linearizado fue sujeto a transcripción *in vitro* utilizando el kit de Ambion Megascript (Ambion Lab Cat. AM1334) o de Epicenter Message MAX T7ARCA- Capped kit (Epicentre Biotechnologies Cat. MMMA60710) usando para ello las condiciones establecidas por el fabricante. Luego de 1 hora de reacción se extrajo el RNA agregando 30 µl de agua libre de RNAsas y 30 µl de solución precipitante de cloruro de litio. Se incubó a -20°C 30 minutos y se centrifugó a máxima velocidad 15 min a 4°C. A continuación, se lavó la pastilla con 1 ml de etanol 70% y se disolvió en agua libre de RNAsas.

5.8._ *Electroforesis de RNA*

Para el gel no desnaturizante, se preparó un gel de agarosa al 0.8% en buffer Tris-acetato y EDTA (TAE) con bromuro de etidio y se cargó con 1 μ l de reacción de transcripción *in vitro* más 4 μ l de buffer de carga para RNA (Ambion). Se corrió a 110 volts en cámara de electroforesis en buffer TAE. Para el gel desnaturizante, se preparó un gel de agarosa al 0.8% en buffer Bis-Tris/PIPES (0.3% PIPES, 0.6% Bis-Tris 0.2% EDTA 0.5 M). Se cargo 1 μ g de de muestra más 10 μ l de buffer de muestra (60% de DMSO, 20% glyoxal desionizado, 12% buffer Bis-Tris/PIPES, 0.6% glicerol y 0.2% de bromuro de etidio). Se corrió a 110 volts en cámara de electroforesis en buffer Bis-Tris/PIPES (14).

5.9._ *Transfección de células Huh7.5.1 y BHK-21*

La transfección con RNA se llevó a cabo por electroporación partiendo de condiciones previamente reportadas (77). Se utilizaron células Huh7.5.1 sembradas un día anterior en una relación 1:2. Las células se trataron con tripsina y se colectaron en buffer PBS estéril frío, ajustando a 1×10^7 células vivas por mililitro. La viabilidad se calculó mezclando 20 μ l de azul tripan con el mismo volumen de células, y contando en una cámara de Newbauer. A menos que se indique lo contrario, se mezclaron en frío 400 μ l de células (4×10^6 células) con 5 μ g de RNA ya sea obtenido a partir de pAVIC o de RNA de células Caco-2 infectadas con HAstV-8. A continuación, se pasó la mezcla a una celda 4 mm y se dio un pulso a 250 V y 950 μ F. Después, las células se pasaron a medio DMEM-

HG tibio y se sembraron en partes iguales en 2 pozos de una caja de 6 pozos (9.5cm²) y otros 2 de una caja de 24 (2 cm²). Se incubaron a 37°C con 5% CO₂ y, una vez pasadas 5 h, se retiró el medio. En el caso de la transfección con pAVIC se sembraron 1 pozo de una caja de 6, 1 pozo de una caja de 24 y 2 pozos de una caja de 48 (1 cm²). Se agregó medio MEM y se incubó a 37°C 20 horas, en el caso de la cinética se cosecharon las células a los tiempos indicados en el ensayo. Se tomó el sobrenadante y las células, para titular el virus. Un pozo de la caja de 24 fue utilizado para teñir por ensayo de inmunoperoxidasa y de otro se lisaron las células para analizar las proteínas. Los pozos de la caja de 48 se usaron para análisis por inmunofluorescencia.

Las células BHK-21 se transfectaron usando 2 métodos distintos con 5 µg de RNA transcrito *in vitro*. En un caso, se usaron las condiciones de transfección previamente descritas con el RNA transcrito *in vitro* de pAVIC (35), electroporando 2x10⁶ células en 0.8ml dando 2 pulsos a 280 V y 250µF, y cosechando a las 20 horas post-transfección. En el segundo método se usaron condiciones descritas para la transfección de BHK-21 usando una clona con el genoma de Semliki Forest virus (51). Se usaron condiciones parecidas a las que se utilizaron con las células Huh7.5.1 pero electroporando dando 2 pulsos de 1.5KV y 25µF.

La eficiencia de transfección fue calculada como el porcentaje de células que expresaban la proteína de la capsida, detectadas por inmunoperoxidasa o inmunofluorescencia. Áreas representativas fueron seleccionadas y fotografiadas usando un microscopio (Nikon diaphot 300) equipado con una cámara (Qimage) y un

microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioscope 2 mot plus) equipado con cámara (Photometrics CoolSnap HQ). Usualmente en tinción de peroxidasa e inmunofluorescencia 5 fotografías con un número mayor a 200 células fueron tomadas. En las áreas seleccionadas se obtuvo el porcentaje total de células teñidas. En todas las fotos tomadas con el microscopio de fluorescencia se usaron los mismos tiempos de exposición. El rendimiento de partículas virales después de la transfección se determinó como unidades formadoras de focos por mililitro (uff/ml). Los lisados celulares se sometieron a 2 ciclos de congelamiento/descongelamiento. La infectividad del virus se calculó como se describió en secciones anteriores.

5.10. *Western Blot*

Las células se lavaron dos veces con PBS estéril al tiempo indicado y cosechadas con buffer de lisis (0.5% SDS, 150mM NaCl, 50mM Tris pH7.4). El lisado celular fue mezclado con cantidad similar de Buffer de carga Laemmli. Las proteínas se resolvieron en gel de poliacrilamida con SDS y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore Cat. HATF00010), que fueron bloqueadas con leche al 5% en solución salina de Tris buffer con Tween-20 0.1% (TBS-T). Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en el mismo buffer y se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron posteriormente y las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia (Luminol reagent, Perkin Elmer Cat. NEL104).

5.11. _ RT-PCR

Se utilizó RNA que se extrajo de células infectadas con HAstV-8. La transcripción reversa fue llevada a cabo usando el kit QIAGEN OneStep RT-PCR (QUIAGEN Cat no. 210212) a 37°C por 30 min usando como primer sentido, Mon344 (5'-TACAGACATGTGCATGAATGG-3'), y como primer antisentido Mon343(-) (5'-CAGGCTTTACCCACAT-3') (8). La mezcla de RT fue preparada conforme las condiciones del fabricante usando 100 µg, 10 µg, 1 µg y 0.1 µg del RNA que se indique. La PCR se llevo a cabo usando un ciclo de 95°C 15 min, para posteriormente dar 15 ciclos de desnaturalización a 94°C 30 s, alineamiento a 55° 30 s y extensión a 72°C 30 s, seguido por una extensión final a 72°C 10 min. La RT-PCR fue llevada a cabo usando un Termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). Los productos de PCR fueron detectados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

6._ RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1._ Las células Huh7.5.1 son permisivas y susceptibles a la infección por HAstV-8 cepa Yuc8.

Para desarrollar un método de genética reversa para un virus de RNA de polaridad positiva se debe tener una línea celular que al ser transfectada con RNA infeccioso producto de la transcripción de una clona de cDNA, sea capaz de traducirlo, replicarlo y ensamblar partículas infecciosas. Con este objetivo, se han probado diferentes líneas celulares evaluando su susceptibilidad a la infección por diferentes serotipos de HAstV (13). Entre aquellas que mostraron una mayor susceptibilidad se incluyeron líneas celulares de origen intestinal (Caco-2, T84, HCT-15), renal (Hek-293, RD, COS-1, VERO) y de origen hepático (PLC/PRF/5), siendo este el origen de las células que evaluaremos para generar el método de genética reversa. Las células de riñón de embrión humano Hek-293, y las células de hepatocarcinoma humano Huh7.5.1 fueron usadas por ser transfectables y por tener antecedentes de ser susceptibles a la infección por HAstV, a diferencia de las células BHK-21, usadas en el método inicialmente establecido por Geigenmüller (27).

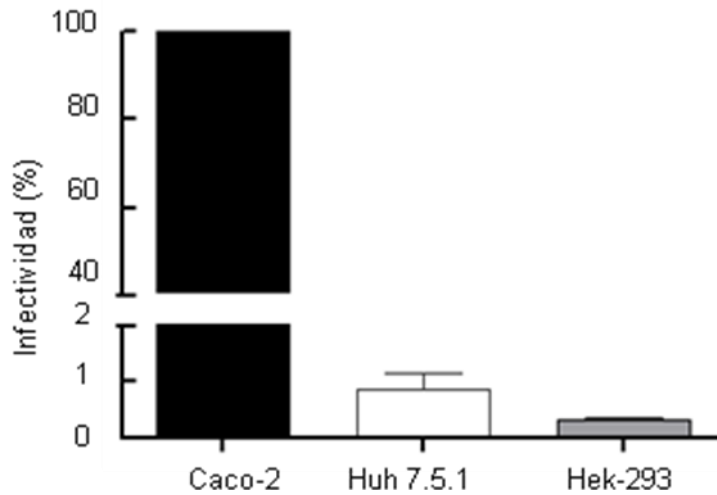


Figura 9: Comparación de la Infectividad de HAsV-8 en células Huh7.5.1 y Hek-293 con respecto a Caco-2. Tres lisados diferentes de HAsV-8 fueron usados para infectar células Caco-2, Huh7.5.1 y Hek-293. La infectividad de los tres lisados fue obtenida y expresada como porcentaje, ajustando como 100% la infectividad calculada en Caco-2.

Para determinar si las células Huh7.5.1 y Hek-293 eran susceptibles y permisivas a la infección por HAsV, en principio se utilizó HAsV-8 proveniente de células Caco-2. Las células infectadas se detectaron por tinción de inmunoperoxidasa utilizando suero anti-HAsV-8, dirigido contra la proteína de la cápside con base a lo cual se determinó el título viral obtenido en cada una de las células mencionadas. Los títulos alcanzados en Huh7.5.1 y Hek-293 fueron aproximadamente 2 logaritmos inferiores a los títulos obtenidos en Caco-2 (Fig. 9). Los bajos títulos observados podrían deberse a una menor susceptibilidad o permisividad a la infección, ya sea que las células tienen una menor capacidad de entrada debido a la falta de receptores para astrovirus o una menor capacidad para la replicación y ensamble de partículas infecciosas respectivamente.

A pesar de su baja infectabilidad, la capacidad para producir partículas virales infecciosas puede variar, por ello se evaluó la permisividad a la infección. Para esto, las tres líneas celulares se infectaron con la misma cantidad de lisado equivalente a una multiplicidad de infección (moi) igual a 1 en células Caco-2, es decir, una partícula infecciosa por célula. El sobrenadante y la fracción celular fueron cosechadas a las 6, 10, 12, 16 y 20 horas para cuantificar el virus total producido así como el virus liberado en células Caco-2. En el caso del sobrenadante, se obtuvieron títulos similares entre las células Caco-2 y Huh7.5.1 así como un aumento progresivo de partículas infecciosas generadas, lo que no se observó en células Hek-293, por esto se podría sugerir que la salida del virus en estas células huésped podría ser diferente a como ocurre en Caco-2 (Fig. 10a). En la fracción celular, los rendimientos virales fueron similares en las líneas celulares Caco-2 y Huh7.5.1, pero fue menor en células Hek-293 (Fig. 10b).

Al titular los mismos lisados en Huh7.5.1 el título fue 100 veces menor, confirmando lo obtenido en el primer experimento (datos no mostrados). El hecho de que las células Huh7.5.1 son capaces de generar la misma cantidad de partículas infecciosas a pesar de infectarse menos que Caco-2, puede que sea debido a que son mejores para replicar o ensamblar el virus, a pesar de ser poco susceptibles a la infección. Hay que tener en cuenta que el método de genética reversa no requiere el proceso de entrada del virus a la célula huésped, por lo que las células necesitan ser altamente permisivas sin importar si son susceptibles o no. Como se dijo anteriormente, las células Huh7.5.1 tienen una respuesta antiviral disminuida debido a la mutación en RIG-I (6), es probable que esta respuesta sea importante para contrarrestar la infección por astrovirus y por ello tengan una alta

permissividad a la infección, sin embargo se deben realizar más estudios para verificar esta hipótesis.

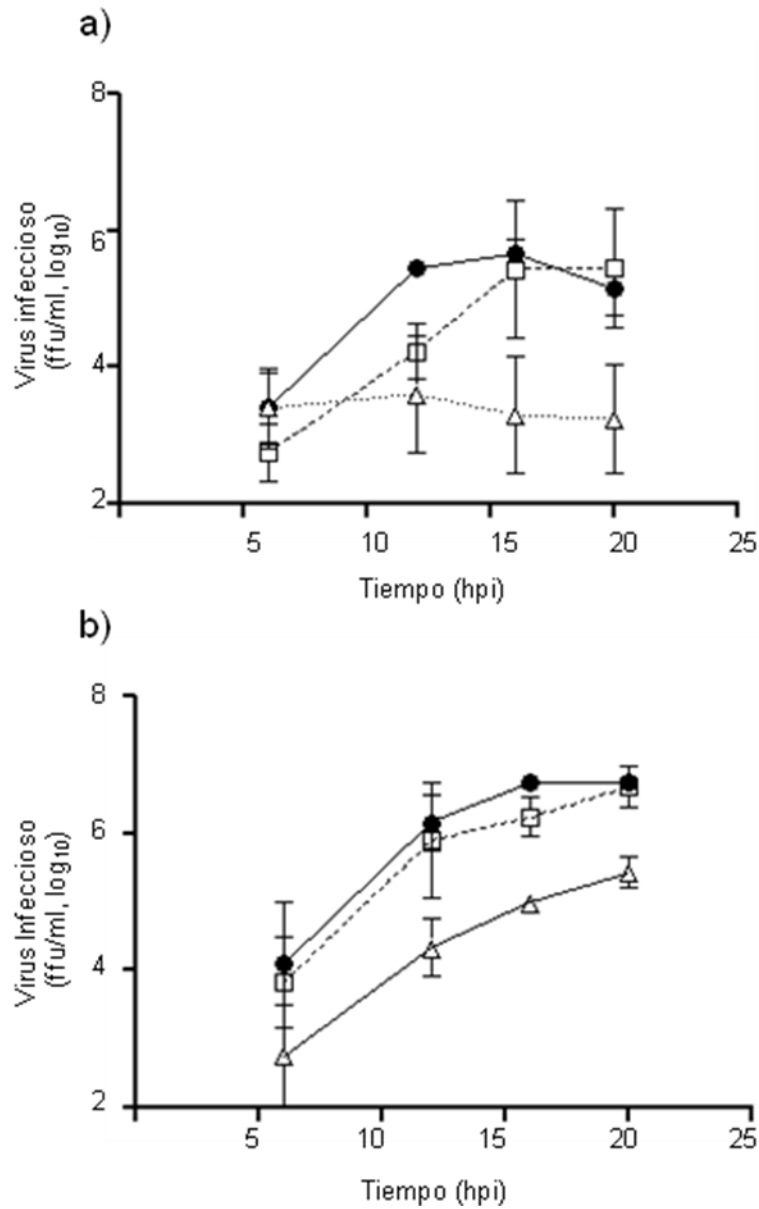


Figura 10: Comparación de rendimientos obtenidos en células Huh7.5.1 y Hek-293 con respecto a Caco-2. Las líneas celulares Caco-2 (círculos cerrados), Huh7.5.1 (cuadrados abiertos) y Hek-293 (triángulos abiertos) se infectaron con la misma cantidad de lisado de HAstV-8 (moi=1 en Caco-2) y el sobrenadante (a) y la fracción celular (b) fueron cosechadas a diferentes tiempos. Los rendimientos se cuantificaron en Caco-2.

Por otro lado, en las células Caco-2 infectadas con HAstV, las proteínas virales no estructurales y estructurales sufren procesamiento proteolítico tanto por la proteasa viral como por proteasas celulares (59, 61). Lo anterior es al parecer determinante en un primer caso para la replicación del genoma y, en el segundo caso, para la salida del virus de la célula. No se ha evaluado si este procesamiento de las proteínas virales ocurre también en otro tipo de células aunque se esperaría que en líneas celulares permisivas el procesamiento de las proteínas no estructurales ocurra de manera similar, ya que éstas participan en la replicación del genoma (39). Como las células utilizadas serán el medio de producción de partículas virales, sería deseable que el ciclo replicativo viral fuera similar a lo que ocurre en Caco-2, ya que en estas últimas es en donde se tiene mejor caracterizado. Para evaluar el procesamiento de las proteínas virales las células Caco-2, Huh7.5.1 y Hek-293 se infectaron con HAstV-8 y se cosecharon a las 20 horas post-infección. Los extractos proteicos se analizaron por Western blot utilizando como anticuerpo primario anti-HAstV-8 que reconoce tanto la proteína estructural VP90 como el producto de su procesamiento VP70 y anti-V-pro dirigido contra la proteasa viral de HAstV-8. Como se esperaba, el producto de procesamiento de la proteasa se detectó en las tres líneas celulares, sin embargo las proteínas estructurales VP90 y VP70 sólo se observaron en células Caco-2 y en Huh7.5.1, pero no en células Hek-293, en donde sólo se observó VP90 (Fig. 11). Por lo anterior, es posible que las caspasas responsables del procesamiento de VP90, importante para la salida del virus, no se activen en las células Hek-293. Es importante mencionar que estas células contienen y expresan los genes E1A y E1B de adenovirus tipo 5 (Ad5), debido a que fueron obtenidas por la transformación de células de riñón de embrión humano con DNA fragmentado de Ad5 (31). En el caso de la proteína E1A, esta es capaz de activar la apoptosis estabilizando a p53 (52), sin embargo, se ha reportado que la proteína E1B es

capaz de inhibir este proceso por la unión a esta misma proteína (54), por lo que puede que la activación de las caspasas por HAstV se vea inhibido por esta última. En cambio, al parecer en las células Huh7.5.1 el ciclo replicativo viral es muy parecido al que ocurre durante la infección de las células Caco-2, por lo menos en lo que se refiere al procesamiento de las proteínas y en la salida del virus. Por otro lado, si tomamos en cuenta la relación de proteína VP70/VP90, podemos observar que en Huh7.5.1 es mayor que en Caco-2, lo que podría sugerir una mayor eficiencia de corte por caspasas celulares en estas células. A pesar de esto, la proporción de virus que sale no es mayor pudiendo ser necesarios otros factores celulares para que el virus salga además del corte proteolítico de VP90.

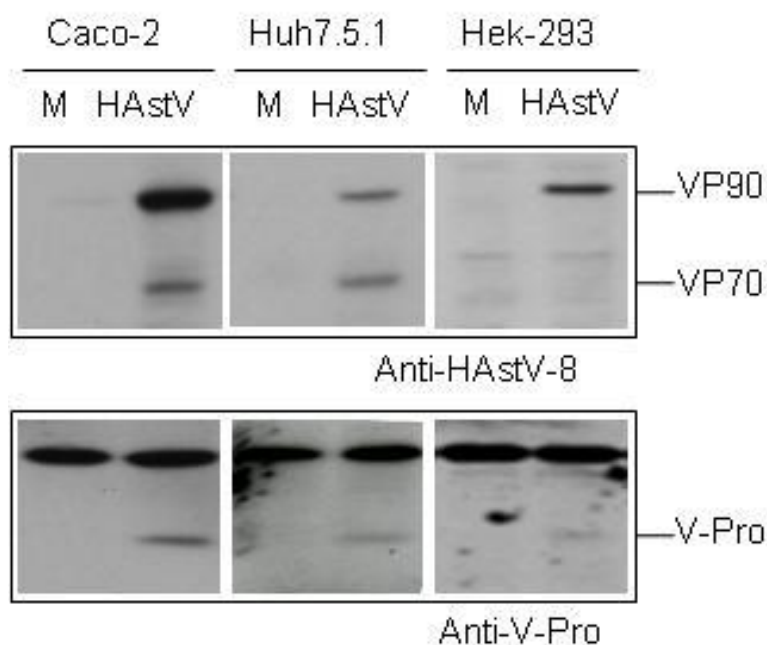


Figura 11: El procesamiento de las proteínas de astrovirus en Huh7.5.1 es similar al ocurrido en Caco-2. Las Células Caco-2, Huh7.5.1 y Hek-293 fueron infectadas o no infectadas (Mock(M)) con HAstV-8 y cosechadas a las 20 horas. Las proteínas se analizaron por Western Blot con anticuerpo primario anti-HAstV-8 y anti-V-pro. Como control de carga se tomó una proteína celular detectada con anti-V-pro

El hecho de que las células Huh7.5.1 se infectan 100 veces menos con respecto a Caco-2 y se genera una cantidad similar de progenie viral, sugiere una mayor capacidad de Huh7.5.1 para generar partículas virales infecciosas. Sin embargo, este efecto puede deberse a la generación de partículas interferentes defectuosas, las cuales son partículas virales con defectos en su genoma que interfieren con la infección de las partículas viables (53). Se ha descrito que la generación de estas partículas es favorecida por la infección a una *moi* alta. Por ello puede ser que al infectar con la misma cantidad de lisado las células Caco-2 y las Huh7.5.1, los títulos sean similares, ya que la *moi* de 1 en Caco-2 correspondería a 0.01 en Huh7.5.1. Para comprobar si realmente las células Huh7.5.1 son más permisivas que Caco-2, ambas líneas se infectaron a una *moi* de 0.01 y se cosecharon a diferentes tiempos para cuantificar el virus producido. Las muestras se titularon en células Caco-2 obteniendo una cinética de infección muy similar en Huh7.5.1 y en Caco-2 a como esta reportado en esta última línea celular (5), además los títulos fueron similares (Fig. 12), con lo cual descartamos que las células Huh7.5.1 fueran más permisivas que Caco-2. Es posible que las células Caco-2 generen una mayor cantidad de partículas interferentes, lo cual se disminuye cuando se utiliza una *moi* baja, reflejándose en los rendimientos.

Al parecer la permisividad en células Caco-2 y Huh7.5.1 es muy similar, obteniendo en las dos líneas celulares rendimientos virales altos a *moi* bajas. Así las Huh7.5.1 aunque poco susceptibles a la infección, generan altos rendimientos de forma similar a Caco-2.

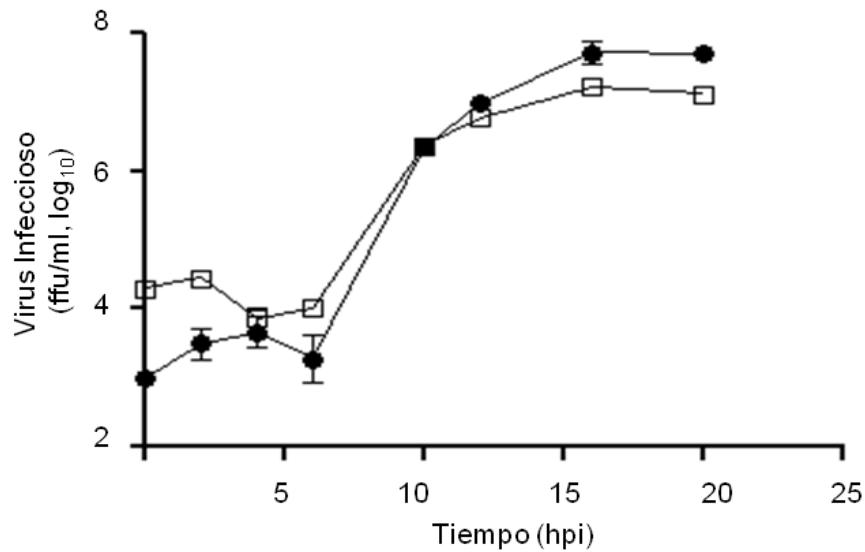


Figura 12: Comparación de rendimientos obtenidos en células Caco-2 y Huh7.5.1 infectadas a una misma moi. Células Caco-2 (círculos cerrados) y Huh7.5.1 (cuadrados) se infectaron con HAstV-8 a una multiplicidad de infección de 0.01. Los lisados fueron cosechados a diferentes tiempos y titulados en Caco-2.

6.2. *Las células Huh7.5.1 son transfectables con RNA viral y capaces de producir progenie viral.*

El método de genética reversa descrito por Geigenmüller et al, se basa en transfectar RNA de HAstV-1 en células BHK-21 para obtener virus. Sin embargo, como antes se mencionó, las células son poco permisivas y no son susceptibles a la infección por astrovirus (13). Debido a esto, se evaluó si las células Huh7.5.1 podrían utilizarse para obtener virus a partir de RNA viral. Como aún no se contaba con RNA transcrito a partir de la clona infecciosa de HAstV-1, se utilizó RNA total extraído de células Caco-2 infectadas con HAstV-8 (Vc-RNA), debido a su infectividad específica (27) y usando la electroporación como método de transfección dada su reproducibilidad (4). Como controles

se utilizó RNA extraído de células sin infectar (Mc-RNA) y RNA de células infectadas después de su tratamiento con RNAsa (Vc-RNA/RNAsa). Además, el Vc-RNA se utilizó como lisado viral para infectar células Caco-2, siguiendo el protocolo establecido, esto para descartar la posibilidad de que hubiera partículas virales infecciosas en esta preparación. Se esperaba que el RNA de células infectadas tuviera suficientes moléculas de RNA viral infeccioso para lograr optimizar el método de transfección.

Así entonces, las células Caco-2 se infectaron o no con HAstV-8 y el RNA total se extrajo a las 20 horas post-infección. Las transfecciones con Vc-RNA y los RNAs controles se llevaron a cabo partiendo de condiciones preestablecidas para esta línea celular usando 3.5µg de cada RNA (77). Posteriormente, las células transfectadas se tiñeron por inmunoperoxidasa con anticuerpo anti-HAstV-8 a las 20 h post-transfección. Se observó que en las células transfectadas con Vc-RNA se expresó proteína viral. (Fig. 13). Dado que, el anticuerpo utilizado reconoce la proteína estructural, la cual se sintetiza a partir del RNA subgenómico, la detección de esta proteína sugiere que hubo replicación y, por lo tanto, la formación de partículas infecciosas. En células transfectadas con Mc-RNA y Vc-RNA/RNAsa no se detectó la presencia de la proteína estructural, por lo que se sugiere que el efecto observado es específico del RNA viral. Además, las células tratadas con Vc-RNA como si este fuese lisado, no se tiñeron por inmunoperoxidasa, descartando la presencia de partículas virales en el RNA extraído (Fig. 13).

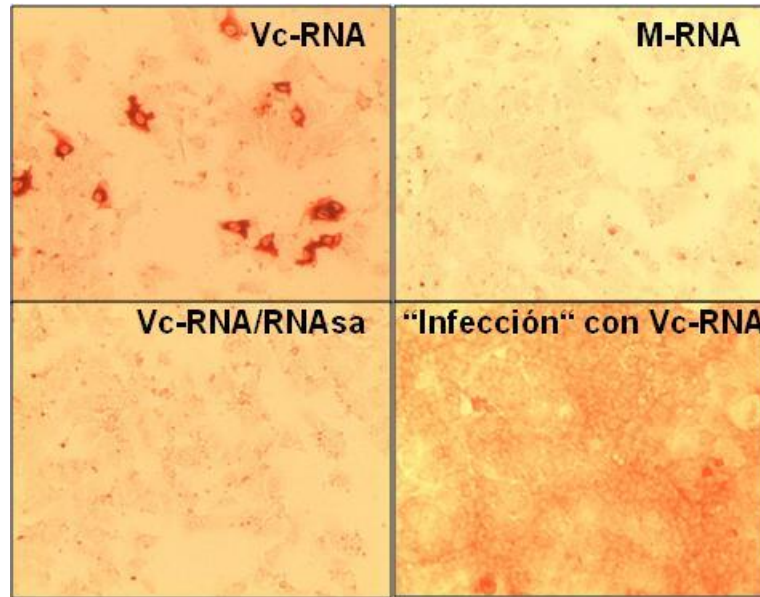


Figura 13: Producción de proteína estructural en células Huh7.5.1 transfectadas con RNA de células infectadas. Las células Huh7.5.1 fueron transfectadas con RNA de células infectadas (Vc-RNA) sin infectar (Mc-RNA)) o con RNA de células infectadas tratadas con RNAsa (Vc-RNA/RNAsa). Las células fueron usadas para realizar tinción de inmunoperoxidasa usando antiHastV-8. Para asegurar que el RNA transfectado no tuviera partículas infecciosas se usó como lisado viral para infectar células Caco-2.

Para confirmar la producción de partículas infecciosas después de la transfección, éstas se cuantificaron por ensayos de inmunoperoxidasa en células Caco-2, tanto en el sobrenadante como en la fracción celular. Los rendimientos de partículas infecciosas obtenidos para el sobrenadante y el lisado celular fueron del orden de entre 10^7 y 10^8 unidades formadoras de focos por mililitro (Uff/ml) respectivamente (Fig. 14), con lo que se confirmó que el RNA viral es por sí mismo infeccioso y capaz de generar partículas virales al ser transfectado en células Huh7.5.1.

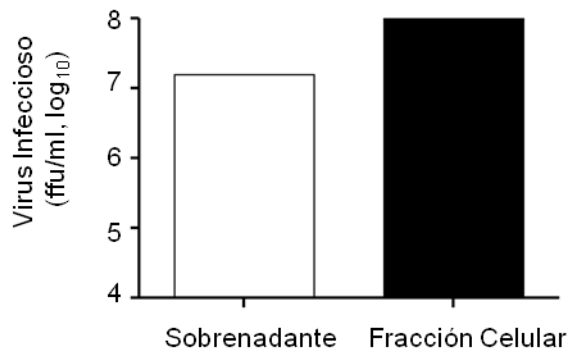


Figura 14: Células Huh7.5.1 transfectadas con RNA viral son capaces de generar progenie viral. Las células Huh7.5.1 se transfectaron con 5µg de RNA de células infectadas. El sobrenadante y la fracción celular se cosecharon a las 20 horas post-transfección y el virus se tituló en Caco-2.

6.3. _ Optimización del método de transfección.

Existen varios parámetros que podrían influir en la eficiencia de transfección, los cuales son importantes para lograr una mayor producción de partículas infecciosas a un ciclo de replicación. En un principio se utilizó RNA de células Caco-2 infectadas con HAstV-8 (Vc-RNA) y se midió la eficiencia de transfección así como el rendimiento viral producido. Los parámetros que se variaron para optimizar el método de transfección fueron el RNA total, la concentración de células y el tiempo de cosecha.

6.3.1. _ Optimización de la cantidad de RNA transfectado.

Inicialmente se varió la cantidad de Vc-RNA, entre 1.5µg y 10µg, empleando 4×10^6 células Huh7.5.1 para su transfección por electroporación en todos los casos. Las células se sembraron como se describió en materiales y métodos y a las 20 horas post-transfección se fijaron y cosecharon para cuantificar el número de células positivas al antígeno viral y el rendimiento de virus producido, respectivamente. Como control se usó RNA tratado con RNAsa durante 30min a 37°C. La eficiencia de la transfección aumentó proporcionalmente con la cantidad de RNA, llegándose a tener más del 50 % de células transfectadas que se pueden detectar por inmunoperoxidasa (Fig. 15a y Fig. 15b). Sin embargo, los títulos de partículas infecciosas siempre se mantuvieron en el mismo rango, alrededor de 10^7 ffu/ml, aumentando ligeramente en relación lineal con el aumento en el número de células que fueron positivas al anti-HAstV-8 (Fig. 15b). Al analizar la proteína de células transfectadas por western blot con anti-HAstV-8, se observó que se producen tanto la proteína de la capsida VP90 como el producto de corte por caspasas VP70, necesario para la salida del virus (Fig. 15c). Como el ciclo replicativo viral en Huh7.5.1 transfectadas es similar a Caco-2 en lo que se refiere al procesamiento proteolítico de VP90 necesario para la salida del virus, esta línea celular podría servir en trabajos futuros para estudiar el procesamiento de la proteína estructural.

Para conocer el rendimiento en partículas infecciosas, se utilizaron las células Caco-2 como se describió anteriormente. Así, los títulos virales aumentaron muy poco, manteniendo una diferencia de 0.5, logaritmos entre la cantidad menor de RNA usada

(6.843ffu/ml,log₁₀) y la mayor (7.345 ffu/ml,log₁₀) (Fig. 15b). De acuerdo a estos resultados, se decidió emplear en lo subsiguiente 5µg para realizar las siguientes transfecciones, ya que se obtuvo un rendimiento viral alto y la variación en el rendimiento cuando se usan entre 3.5 a 10µg fue mínima.

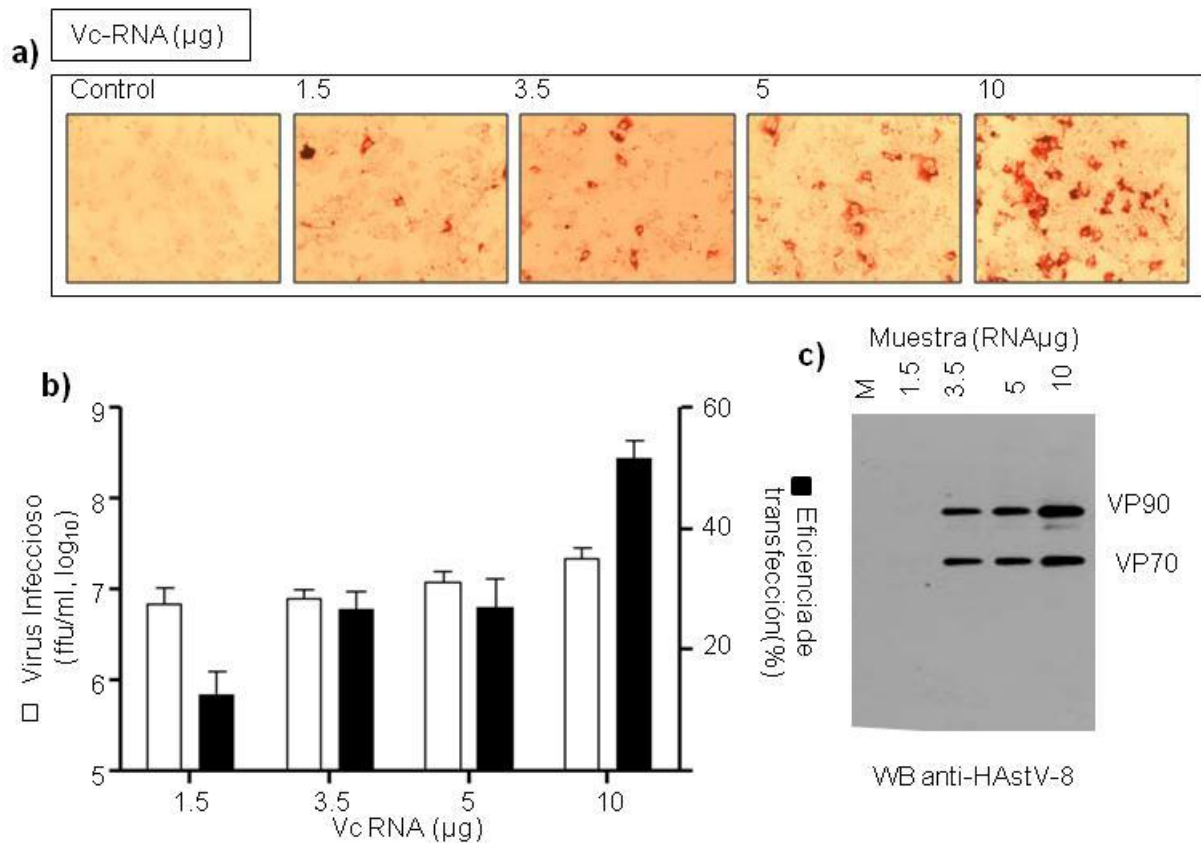


Figura 15: Transfección de células Huh7.5.1 con diferentes cantidades de Vc-RNA. 4×10^6 células Huh7.5.1 fueron transfectadas con diferentes cantidades de Vc-RNA o con 10 µg de Vc-RNA/RNAsa (control). Las células transfectadas fueron sembradas y teñidas por el método de inmunoperoxidasa (a) o cosechadas a las 20 horas post-transfección. Fue calculada la eficiencia de transfección (barras negras) y los lisados fueron titulados en Caco-2 para calcular el rendimiento (barras blancas) (b). Se tomaron muestras de proteína de cada transfección y se analizaron por western blot anti-HAstV-8 observando el procesamiento de la proteína estructural (c).

6.3.2. _Rendimiento viral utilizando diferentes cantidades de células.

Utilizando 5µg de Vc-RNA y variando la cantidad de células entre 2 y 8×10^6 células por transfección, se observó que el número total de células que expresaban el antígeno viral incrementó (Fig. 16a), a pesar de que la eficiencia de transfección disminuyó, conforme aumentó la cantidad de células utilizadas en la transfección (Fig. 16b). A partir de 4×10^6 los rendimientos virales no tuvieron un cambio significativo (Fig. 16b). Como control se utilizaron 5µg de RNA tratado previamente con RNAsa para transfectar 4×10^6 células. El hecho de que la eficiencia de transfección disminuyó puede ser explicado por que se transfectó la misma cantidad de células y la eficiencia se representa en porcentaje; es evidente que mientras sea mayor la cantidad de células, disminuirá la relación entre las que se transfectaron y el total que se utilizaron. Probablemente debido a que la cantidad de células transfectadas en cada caso fue parecida. Con base a los resultados se siguió usando 4×10^6 células y 5µg de RNA en experimentos posteriores ya que no se presentó ningún cambio significativo en el rendimiento viral con una mayor cantidad de células.

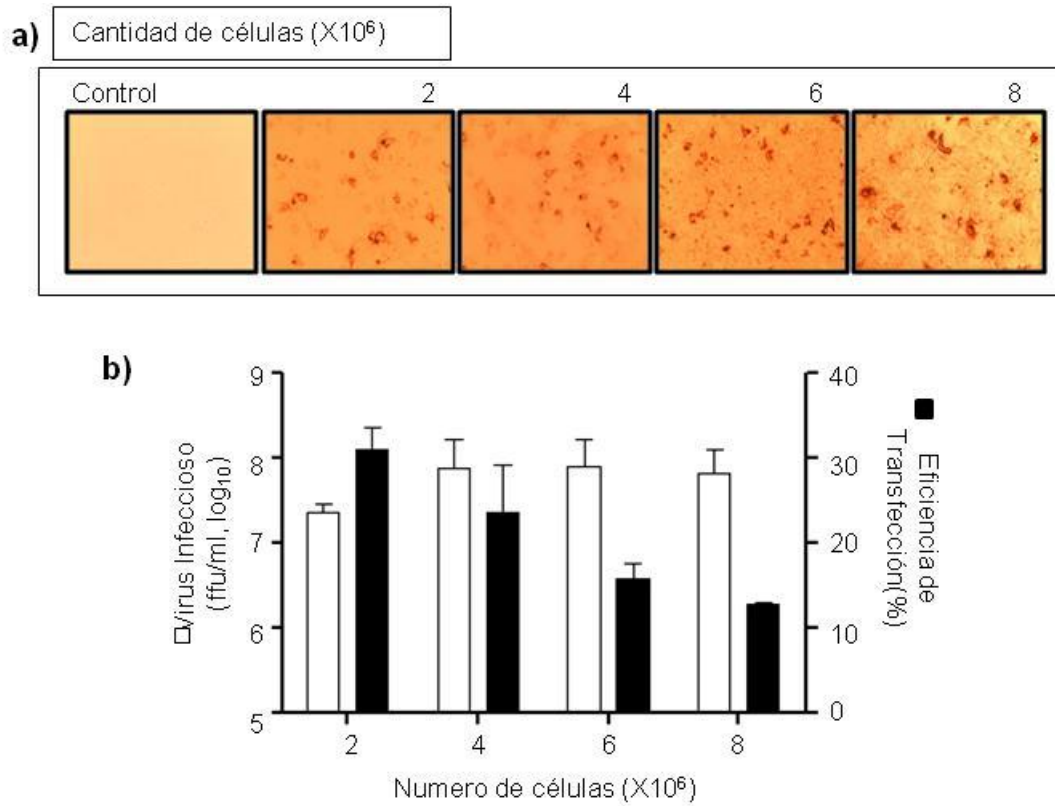


Figura 16: Transfección de células Huh7.5.1 usando diferentes cantidades de células Huh7.5.1. Diferentes cantidades de células Huh7.5.1 fueron transfectadas con $5\mu\text{g}$ de Vc-RNA o 4×10^6 células se trataron con Vc-RNA/RNAsa (Control). La células transfectadas fueron sembradas y teñidas por el método de inmunoperoxidasa (a) o cosechadas a las 20horas post-transfección (b). La eficiencia de transfección (barras negras) y el rendimiento de partículas infecciosas (barras blancas) se obtuvieron como se describió en la figura 14.

6.3.3. _Rendimiento viral a diferentes tiempos de cosecha.

Como se mencionó anteriormente al transfectar el RNA viral se evita el proceso de entrada del virus a la célula, probablemente acortando el tiempo al cual se produce el máximo rendimiento de partículas infecciosas. Como uno de los principales objetivos de este trabajo era disminuir el tiempo de cosecha para evitar la generación de mutaciones inespecíficas debido a múltiples ciclos de replicación (70), evaluamos el tiempo al cual se alcanza el mayor título viral al menor tiempo posible posterior a la transfección. Las células Huh7.5.1 se transfectaron con Vc-RNA y se cosecharon a las 6, 10, 12, 16 y 20 horas post-transfección. Al mismo tiempo se infectaron células Huh7.5.1 a una moi de 0.27 por ser ésta la moi correspondiente a la eficiencia de transfección promedio que usualmente se había obtenido en experimentos previos, utilizando las mismas condiciones (4×10^6 células y $5 \mu\text{g}$ de RNA total), y de esta forma tener un punto de comparación entre la cinética que sigue la transfección de RNA y la infección normal. Como control de la transfección se uso Vc-RNA/RNAsa. Los rendimientos obtenidos fueron muy similares a los obtenidos por la infección alcanzando títulos mayores de 10^6 uff/ml a partir de las 12 horas y de alrededor de 10^7 entre las 16 y 20 horas (Fig. 17). Los rendimientos obtenidos por la infección con HAstV-8 fueron muy similares a los obtenidos en la transfección. Sin embargo, durante la transfección se notó un ligero retraso para alcanzar el máximo de partículas infecciosas producidas. Es posible que el estrés generado por el shock eléctrico durante la electroporación afecte la producción de progenie viral a tiempos tempranos y ello sea la causa del retraso.

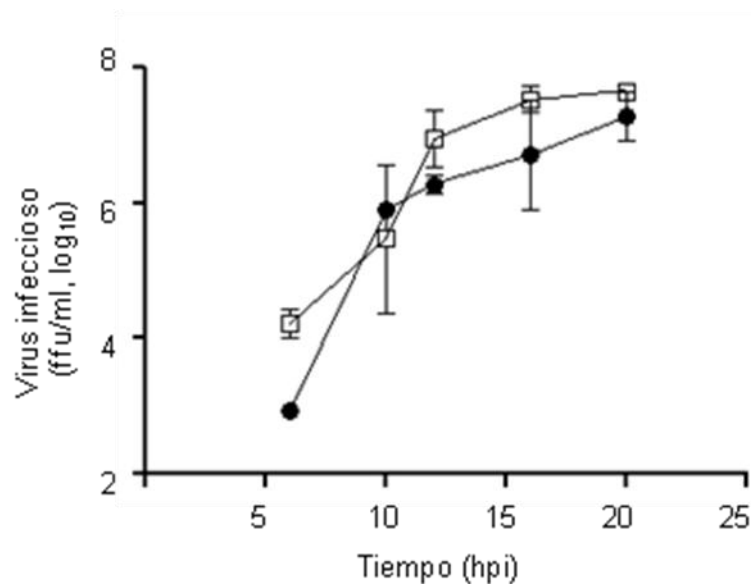


Figura 17: Análisis comparativo entre el rendimiento obtenido de células infectadas por HAsV-8 y transfectadas con Vc-RNA. 4×10^6 células Huh7.5.1 fueron transfectadas con $5 \mu\text{g}$ de Vc-RNA (círculos cerrados). Al mismo tiempo, células Huh7.5.1 fueron infectadas con HAsV-8 a una moi de 0.27 (cuadrados). Las células se cosecharon a los tiempos post-transfección indicados y el virus producido se cuantificó en células Caco-2.

Resumiendo los resultados de los experimentos anteriores, el máximo rendimiento de virus se alcanzó utilizando $5 \mu\text{g}$ de Vc-RNA y 4×10^6 células y cosechando los lisados a las 16 horas, condiciones a las que se pueden alcanzar títulos virales entre 10^7 y 10^8 ffu/ml.

6.4. _ El RNA obtenido a partir de pAVIC al ser transfectado en células Huh7.5.1 produce virus infeccioso.

Como se mencionó anteriormente en nuestro laboratorio se cuenta con la clona infecciosa de HAstV-1 pAVIC, sin embargo se desconocían los parámetros óptimos para realizar transcripción *in vitro* y obtener RNA integro en gran cantidad. En un principio, se probaron dos kits diferentes para realizar la transcripción *in vitro*: Megascript (Ambion) en presencia de m7G(5')ppp(5')G, y T7ARCA (Epicentre) que incluye análogos de cap anti-reversos (ARCA) en la reacción. La diferencia entre estos dos kits parece ser la eficiencia con la que el transcrito obtenido incorpora cap en su extremo 5' en la orientación correcta siendo mejor el kit T7 ARCA (Epicentre), lo cual, es necesario para una traducción óptima del RNA dentro de la célula (32, 65).

Utilizando las condiciones de transfección optimizadas con Vc-RNA, se llevó a cabo la transfección con RNA obtenido a partir de la clona pAVIC. Este RNA (iv-RNA) se obtuvo por transcripción *in vitro* como se describió en materiales y métodos utilizando los kits Megascríp y T7ARCA. El RNA obtenido se purificó y analizó en un gel de agarosa al 0.8% para confirmar la integridad (Fig. 18a). A pesar de que la integridad del RNA no fue óptima, se utilizó para transfectar células Huh7.5.1 . La eficiencia de transfección resultó menor que la obtenida con el Vc-RNA (7.27 ffu/ml, log₁₀), aunque el RNA obtenido con el kit T7ARCA tuvo mayor infectividad (5.78 ffu/ml, log₁₀) en comparación con el kit Megascript (5.48 ffu/ml, log₁₀). Asimismo, el rendimiento viral fue mayor en los lisados provenientes de células transfectadas con RNA obtenido con el kit T7ARCA (Fig. 18b y 18c). Como antes se mencionó, la eficiencia en la adición del cap en la orientación correcta en el extremo 5' podría explicar este resultado, aunque no confirmamos esta posibilidad.

Cabe resaltar, que el rendimiento de virus y la eficiencia de transfección fueron menores que cuando se utilizó RNA de células infectadas. Es posible que estas diferencias sean debido a la presencia de RNA de origen celular, por lo que en los siguientes experimentos se evaluó esta posibilidad.

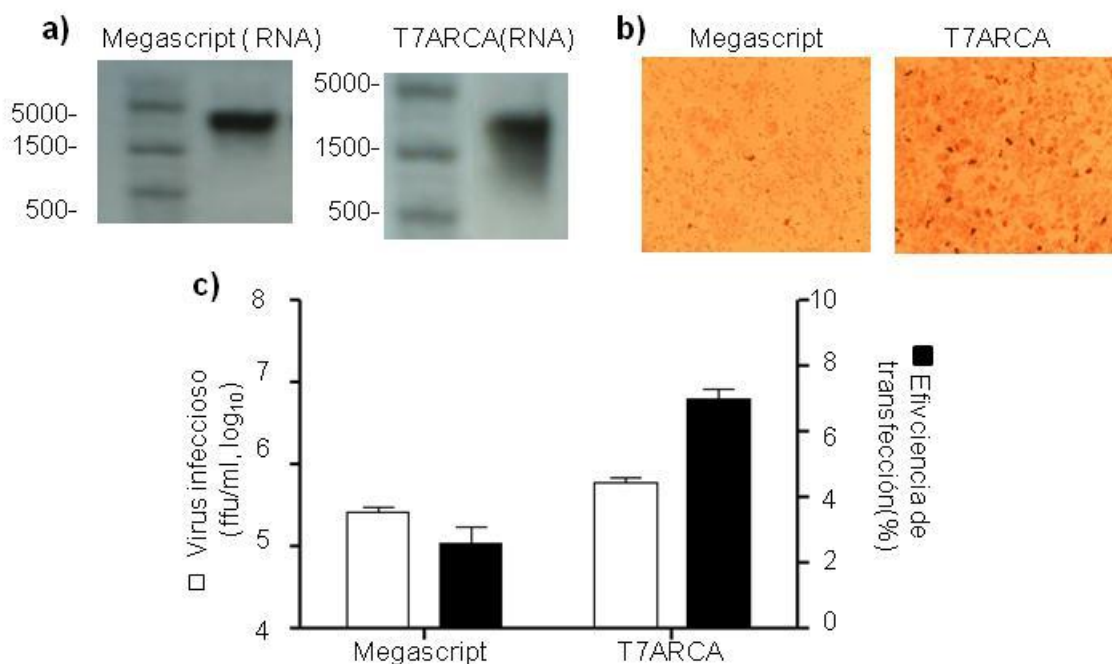


Figura 18: Comparación de la infectividad de RNA transcrito *in vitro* por dos distintos kits. La clona pAVIC fue linearizada y sujeta a transcripción *in vitro* usando dos kits distintos, Megascript y T7ARCA. El RNA obtenido por transcripción *in vitro* se cargo en un gel de agarosa con bromuro de etidio para determinar el grado de degradación (a), Las células transfectadas se sembraron y tiñeron por inmunoperoxidasa (b) o se cosecharon a las 20 horas post-transfección para cuantificar el virus producido. El rendimiento (barras blancas) y la eficiencia de transfección (barras negras) fueron calculados (c). Los respectivos lisados se titularon en células Caco-2.

6.5. _ El método desarrollado con Huh7.5.1 es mas eficiente que aquellos previamente descritos usando BHK-21.

En el método ya descrito de genética reversa para HAstV-1 se usaron células BHK-21, las cuales eran poco permisivas a la infección. Con el objetivo de comparar la eficacia del sistema en células Huh7.5.1, se realizaron transfecciones simultáneas de las dos líneas celulares usando iv-RNA de la clona pAVIC. Las células BHK-21 fueron transfectadas usando dos métodos de electroporación distinto. El método I se ha usado para generar partículas infecciosas a partir de RNA transcrito *in vitro* de pAVIC (35). En el método II se usaron las condiciones descritas para el rescate de Semliki Forest virus a partir de RNA viral (51). En todos los casos, se usarón 5µg de RNA y la cosecha de las células se llevó a cabo a las 20 horas post-transfección. La eficiencia de la transfección así como el rendimiento de partículas infecciosas se determinaron como se describió anteriormente.

Las células BHK-21 transfectadas mostraron la expresión de la proteína de la cápside por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-HAstV-1, teniendo un patrón de tinción similar al observado en las células Huh7.5.1 (Fig. 19a). La eficiencia de transfección del método I con BHK-21 (10.44%) fue muy similar a cuando se usaron células Huh7.5.1. con iv-RNA (7.3%). Sin embargo, los rendimientos virales fueron alrededor de 2 unidades logarítmicas mayores cuando utilizamos las células Huh7.5.1 (5.48 ffu/ml, \log_{10} contra 4 ffu/ml, \log_{10}) lo que nos indica que son más permisivas a la infección por HAstV. En comparación con el método de transfección I, tanto la eficiencia como el rendimiento fue menor al usar el método II. Cuando se comparó el rendimiento de las células Huh7.5.1 transfectadas con iv-RNA (5.48ffu/ml, \log_{10}) y aquellas transfectadas con

Vc-RNA (7.0 ffu/ml, \log_{10}) la diferencia fue de aproximadamente 1 logaritmo, siendo mayor en estas últimas (Fig. 19b). Este resultado indica que existen diferencias entre las dos transfecciones que afectarían la infectividad de un RNA con respecto de otro. Entre estas diferencias esta el RNA celular, que al contrario de lo que pasa con la transfección con iv-RNA, el Vc-RNA incluye RNA celular de las células Caco-2 de las cuales de extrajo, el cual es transfectado a la par del RNA viral. Este RNA celular podría contener mRNA que puedan ser traducidos en Huh7.5.1, generando proteínas que promuevan la generación de partículas infecciosas. Por otro lado, es posible que el RNA generado durante una infección sufra modificaciones que no tenga el transcrito *in vitro*. Para HAstV se ha sugerido que podría contener la proteína llamada VPg unida covalentemente en el extremo 5' de su RNA genómico (3). Esta proteína puede funcionar como sebadora durante la replicación del RNA viral y además como proteína de anclaje para los factores celulares involucrados en la traducción de los mRNAs tal como se observa en picornavirus (1) y calicivirus (38). El iv-RNA por su parte, contiene cap en su extremo 5', lo que podría resultar en una replicación y traducción menos eficiente.

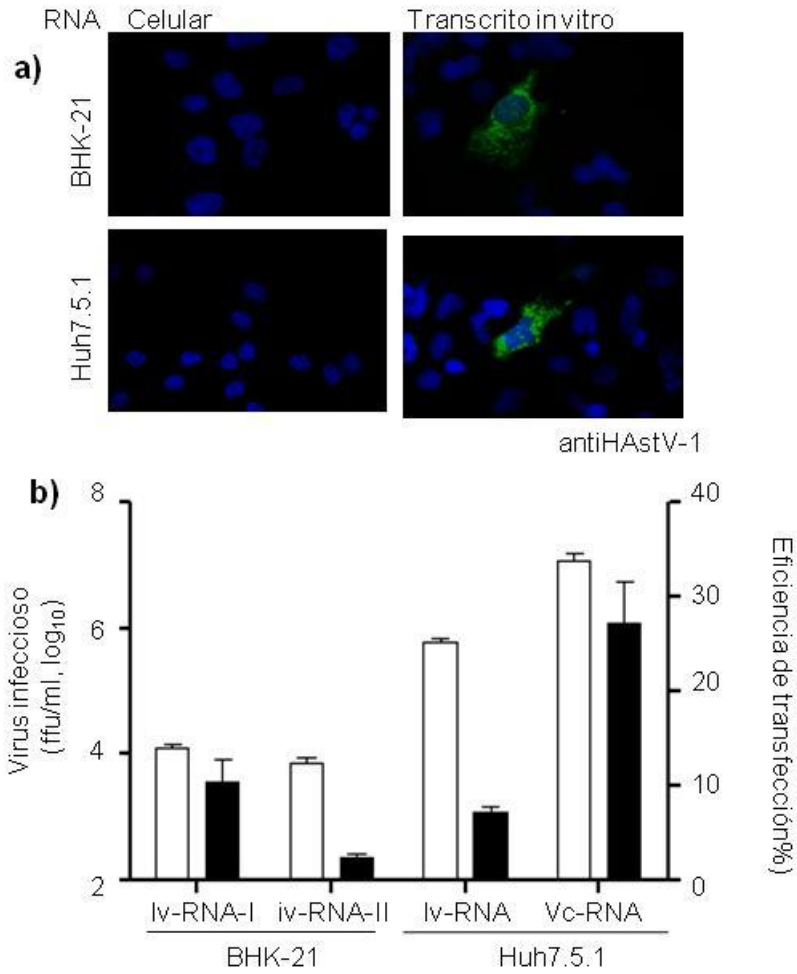


Figura 19: La transfección de las células Huh7.5.1 genera una mayor cantidad de progenie viral que con los métodos ya descritos para BHK-21. Las células BHK-21 se transfectaron por 2 métodos diferentes I y II. Las células Huh 7.5.1 se transfectaron con iv-RNA o con Vc-RNA con las condiciones preestablecidas. Los rendimientos (barras negras) y la eficiencia de transfección (barras blancas) fueron cuantificados a las 20 horas post-transfección como se describió anteriormente (b).

6.6. _ El RNA celular no afecta el rendimiento de partículas infecciosas en las transfecciones hechas con RNA de la clona pAVIC.

Existe la posibilidad de que el RNA celular al ser transfectado en conjunto con RNA viral favorezca la recuperación de virus infeccioso; ya sea que la presencia de mRNA celular favorezca la traducción de proteínas en las células transfectadas, que ayuden a la replicación viral o que actúe evitando la acción de las RNAsas celulares al diluir el RNA viral.

Para probar si el RNA celular favorece la recuperación de virus infeccioso después de la transfección, se utilizaron diferentes cantidades de RNA obtenido a partir de pAVIC mezclado con RNA de células Caco-2 sin infectar. Esto dio como resultado que la eficiencia de transfección y el rendimiento de virus obtenido en cada transfección fuera similar (Fig. 20a). Para comprobar si la dilución del RNA viral ayuda a obtener mejores rendimientos de la transfección de RNA de pAVIC, se mezclaron diferentes cantidades de RNA de la clona con una cantidad fija de RNA celular. La eficiencia de transfección y el rendimiento obtenido variaron de acuerdo a la cantidad de RNA de pAVIC utilizada, decreciendo cuando se utilizó una menor cantidad del mismo y aumentando al transfectar más RNA de pAVIC (Fig. 20b).

Debido que la cantidad de RNA celular no contribuyó a un mejoramiento en la eficiencia y rendimiento obtenido sino que, por el contrario, llevó a un ligero decremento al compararlo con el control sin este RNA; es evidente que el RNA celular por sí mismo no ayuda a la infección por RNA viral. Por lo tanto, es posible que el RNA viral generado durante la

infección sufra modificaciones que incrementen su infectividad, las cuales no están presentes en el RNA generado *in vitro*.

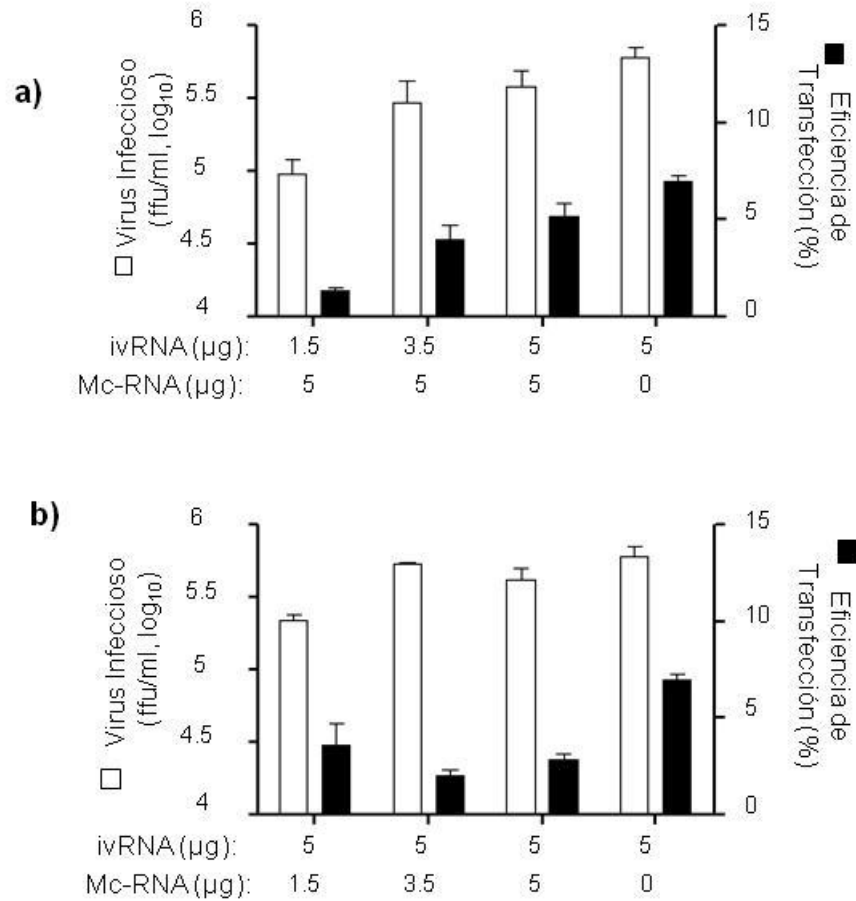


Figura 20: El RNA celular no es determinante en la infectividad de RNA viral. Las células Huh7.5.1 se transfectaron con 5 μg de iv-RNA de la clona pAVIC y diferentes cantidades de Mc-RNA (a) o con diferentes cantidades de ivRNA y 5 μg de Mc-RNA (b). La eficiencia de transfección (barras negras) y el rendimiento de partículas infecciosas (barras blancas) fueron determinadas a las 20 horas post-transfección y los lisados fueron titulados en células Caco-2.

6.7._ El tratamiento con proteasa inhibe la infectividad del RNA extraído de células infectadas.

Como el RNA celular no promovió la recuperación de virus después de la transfección con RNA de pAVIC, es posible que el RNA extraído de células infectadas tuviera características únicas que promuevan su infectividad. Con base en su analogía con virus relacionados como los calicivirus y al análisis de secuencias (3), era probable que este RNA contenga una proteína VPg asociada a su extremo 5', la cual podría contribuir a su replicación o traducción.

Para probar si la asociación de un factor proteico (VPg) podría contribuir con un aumento en la eficiencia y en el rendimiento de virus al transfectar Vc-RNA, este RNA se trató con proteinasa K durante 30 min a 37 °C y se utilizó para transfectar, comparándolo al mismo tiempo con Vc-RNA sin tratamiento. Para verificar que el RNA se encontrara íntegro después del tratamiento con proteasas, el RNA ribosomal se analizó por geles de agarosa y el RNA viral por RT-PCR semi-cuantitativo con oligonucleótidos específicos. La cantidad de producto de origen viral se redujo drásticamente en la tercera dilución, usando 15 ciclos tanto en el tratado como en el no tratado indicando que el RNA viral no se degradó por el tratamiento con la proteasa (Fig. 21a). Además, se cargó un gel desnaturizante para RNA con las muestras tratadas y sin tratar en el cual se pudo observar la integridad de los RNA ribosomales 28 y 18S independientemente del tratamiento (Fig. 21b), confirmando que este no afectó a las moléculas de RNA.

Una vez comprobada la integridad del Vc-RNA, éste se utilizó para transfectar las células Huh7.5.1 y se evaluó la recuperación de virus infeccioso. En estas condiciones, no

se detectaron células teñidas al transfectar con Vc-RNA previamente tratado con proteasa (Fig. 20c) y por otro lado, no se obtuvo un título viral detectable. En cambio, las células transfectadas con Vc-RNA no tratado con proteasas tuvieron una eficiencia del 20% y se recuperó virus con un título aproximado de 10^7 ffu/ml (Fig. 21d).

Como en el caso de la transfección con RNA tratado no fué posible observar infección ni traducción de proteínas, es probable que se requiera de alguna proteína que está siendo degradada por la proteasa y que se mantuvo unida al Vc-RNA a pesar del tratamiento con trizol. Es posible que el RNA viral tenga en su extremo 5' una proteína VPg haciéndolo más infeccioso que aquel que sólo tiene cap. En poliovirus, la proteína VPg es importante en la replicación del genoma (1) a diferencia de lo que ocurre en calicivirus en donde participa aparentemente sólo en la traducción del genoma (15, 29, 38). En astrovirus aún no hay reportes que confirmen la traducción de esta proteína durante una infección, por lo que este resultado es una evidencia indirecta de su posible existencia e importancia en el ciclo replicativo viral. Además de que el RNA viral de calicivirus también pierde infectividad al ser tratado con proteinasa K, asociándose este efecto con la pérdida de VPg (38).

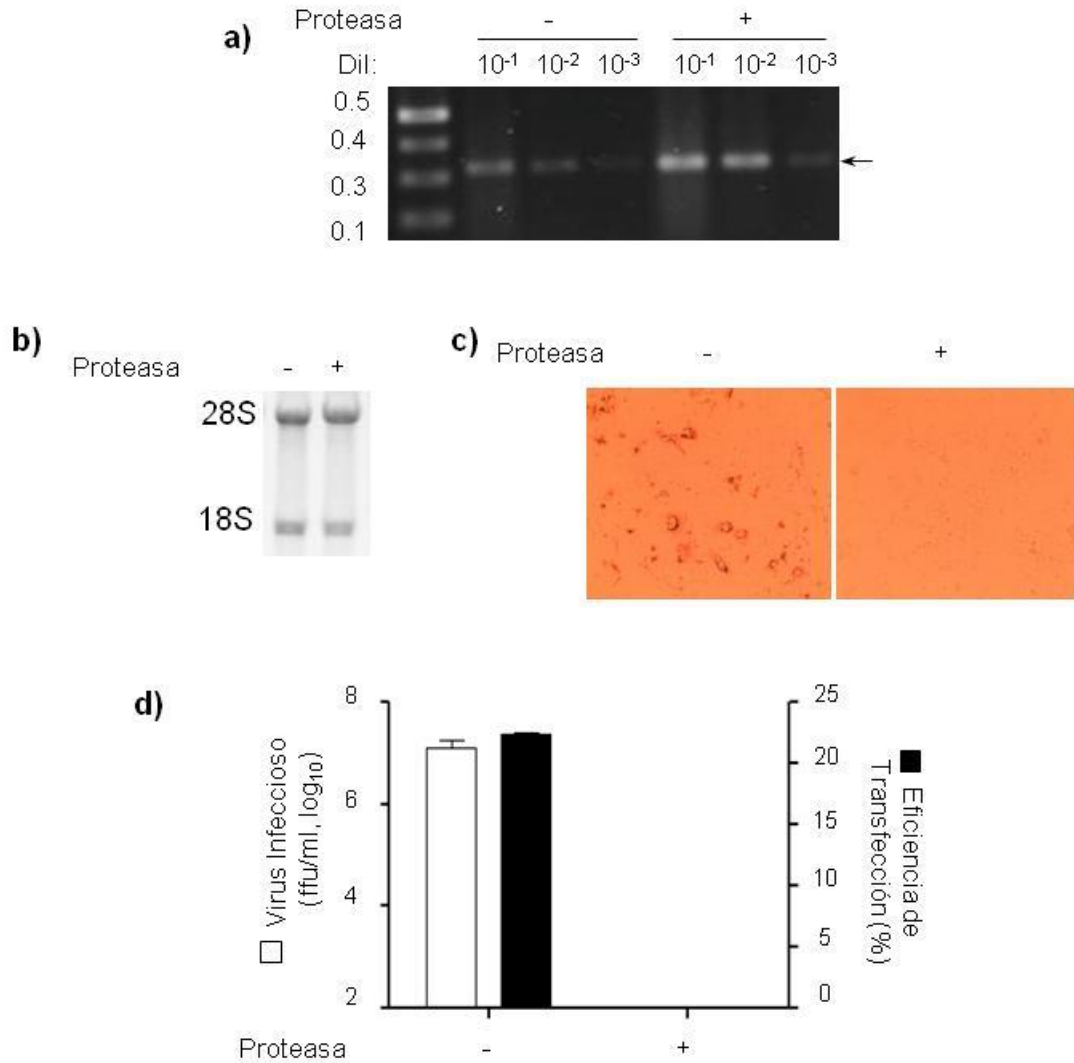


Figura 21: La infectividad del Vc-RNA es debida a un factor proteico. Vc-RNA se trató o no con proteasa y fue usado para transfectar células Huh7.5.1. Para determinar que el tratamiento con proteasas no afecte la integridad del RNA, se realizó un análisis semicuantitativo por rtPCR usando RNA a distintas diluciones a 15 ciclos (a); además la integridad de los RNA ribosomales se observó en un gel desnaturizante (b). Sólo las células transfectadas con RNA sin tratamiento fueron teñidas por inmunoperoxidasa (c). El rendimiento (barras blancas) y la eficiencia de transfección (barras negras) se evaluó como se describió anteriormente (d).

7._ UTILIZACIÓN DE LA CLONA:

7.1._ Proteína hipotética sm en el marco de lectura X.

Una vez que el método de genética reversa con HAstV-1 se estandarizó para las células Huh7.5.1 y se obtuvieron mejores rendimientos con respecto a aquellos obtenidos con el método descrito en reportes previos, se quiso evaluar este sistema para el análisis de mutaciones puntuales en regiones que pudieran tener alguna relevancia en el ciclo de replicación del virus. Para esto, se analizó la expresión de un posible marco de lectura alternativo y el papel que pudiese tener de ser traducido, como se explica a continuación.

Es particularmente común en virus de RNA la existencia de genes, donde la misma secuencia de nucleótidos codifica para varias proteínas. Entre aquellos que tienen ORFs pequeños donde su codón de inicio sobrelapa con el de un ORF mayor, tenemos al virus de hepatitis C (HCV) y al de hepatitis E (HEV), rotavirus, flock house virus (FHV) y cucumber mosaic virus (CMV) (Fig. 22). Todas estas proteínas son traducidas durante la infección, sin embargo sólo de pocas de ellas se conoce su función. Las proteínas 2b de CMV y B2 de FHV son proteínas importantes para la formación de partículas virales ya que inhiben la respuesta antiviral del huésped evitando la formación de siRNA en la célula infectada (37, 50). Por otro lado, las proteínas NSP6 de rotavirus, la proteína F de HCV y la proteína del ORF3 de HEV no parecen indispensables durante la infección celular. Por lo que se ha propuesto que la función de la proteína NSP6 está relacionada con los eventos que ocurren durante la síntesis y replicación del RNA en el viroplasma, dada su gran

afinidad por unirse a RNA y DNA, además de su colocalización con NSP5 dentro de los viroplasmias (67). En cambio, la proteína F de HCV se ha pensado que podría participar en la persistencia de la infección viral en el huésped debido a los altos títulos de anticuerpos encontrados en pacientes en estadios avanzados de la enfermedad (76). En el caso de la proteína del ORF3 de HEV se sabe que es indispensable durante la infección en monos, además que podría tener un papel en la optimización del ambiente celular para la infección, así como en la entrada del virus (2).

Para astrovirus y otros virus como seadornavirus, cytorhabdovirus y coronavirus, recientemente se predijo la existencia de marcos de lectura adicionales a los ya descritos, que podrían traducirse en proteínas potencialmente importantes para el virus (23). En el caso particular de astrovirus, se encontró un pequeño marco de lectura adicional a los 3 reconocidos, inmerso en la región correspondiente al extremo 5' del ORF2 (Fig. 22). Este marco de lectura está conservado en los 8 serotipos de astrovirus humanos y en otros Mamastovirus aislados de cerdo, gato, delfín, león marino y perro, siendo más corto en este último. Este marco de lectura alternativo, denominado ORFX, se encuentra entre los nucleótidos 4369 al 4710 en astrovirus humanos y, de ser traducido, produciría una proteína de 112 aminoácidos (23). El marco de lectura inicia 45 nucleótidos corriente abajo del codón de inicio usado para la traducción de la proteína estructural, VP90, superlaponando en posición +1 sobre el ORF2.

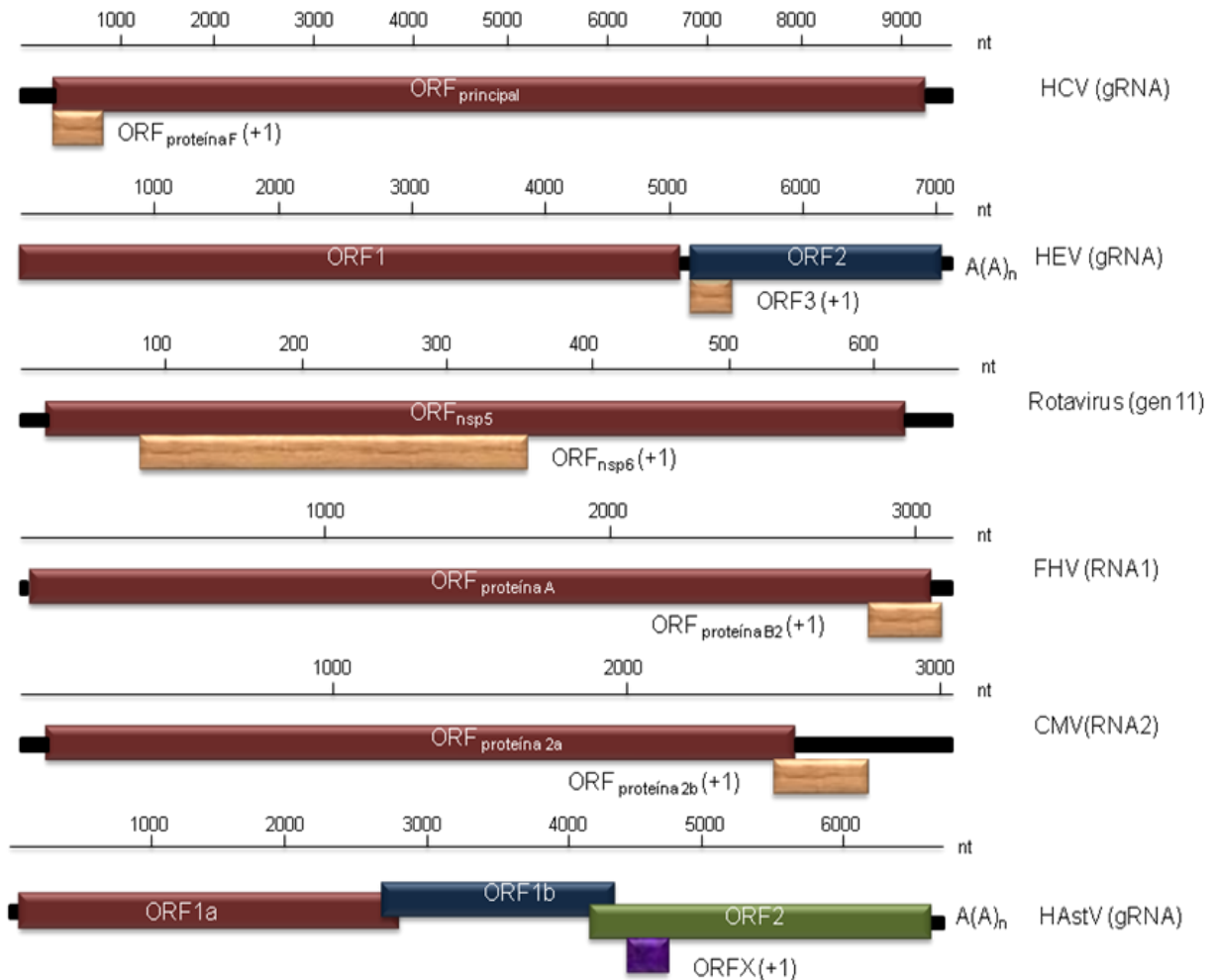


Figura 22: Virus con pequeños marcos de lectura sobrelapados en marcos de lectura mayores. Se muestra la posición de marcos de lectura pequeños los cuales sobrelapan en posición +1 sobre marcos de lectura mayores de diversos virus. De esta forma tenemos los ORF que codifican para: la proteína F de hepatitis C (HCV), la proteína del ORF3 de hepatitis E (HEV), la proteína Nsp6 de rotavirus, la proteína B2 del virus de flock house (FHV), la proteína 2b de virus del mosaico del pepino (CMV) y además aquel predicho para la proteína del ORFX de astrovirus. Las regiones no traducidas se indican con recuadros negros, también se indica el RNA representado ya se genómico (gRNA) o un RNA específico (gen11, RNA1 o RNA2), además el o los ORF principales.

A pesar de que el codón de inicio del ORF2 se encuentra en un buen, aunque no óptimo, contexto de Kozak con G en la posición -3 y G en +4, éste se encuentra a 12 nucleótidos del extremo 5' del RNA subgenómico. Se ha reportado que lo anterior, favorece el comienzo de la traducción en codones de inicio posteriores al inicial por el proceso denominado "leaky scanning", independientemente del contexto en el que se encuentre (71). Durante ensayos de expresión *in vitro* del ORF2 de HAstV-1, fueron detectados 2 productos principales, uno de 87kDa y otro de aproximadamente 10 kDa (49), siendo éste el tamaño que correspondería a la proteína traducida del ORFX, la cual denominamos proteína small (sm). Teniendo en cuenta lo anterior, es posible que la proteína sm sea traducida durante la infección, aunque este hecho y su relevancia en el ciclo replicativo viral aún no se ha estudiado.

7.2._ Análisis teórico de la proteína sm.

Con la intención de saber si la proteína sm pudiese tener relevancia durante el ciclo replicativo viral, se llevaron a cabo diferentes análisis que pudiesen darnos un indicio de su función. Aunque el ORFX se encuentra conservado dentro del género Mamastovirus, la proteína traducida podría variar entre los diferentes HAstV. Al realizar alineamientos entre los serotipos humanos utilizando el programa ClustalW 2.0 (47) se observó que existe una región altamente conservada entre los aminoácidos 30-63 con una gran cantidad de aminoácidos polares, incluyendo un alto contenido de serinas que hace probable la existencia de posibles sitios de fosforilación que podrían llevarse a cabo dentro de la célula. Otra región medianamente conservada se encuentra hacia el extremo carboxilo terminal, la

cual es muy rica en leucinas, de las cuales, algunas se encuentran conservadas en todos los serotipos. Se ha reportado que dominios ricos en leucinas se encuentran presentes en dominios de unión proteína-proteína importantes en transducción de señales, por lo que la proteína sm pudiese tener funciones similares (44) (Fig. 23).



Figura 23: Alineamiento de las regiones traducidas del ORFX de los 8 serotipos humanos. Se realizó un alineamiento utilizando el programa ClustalW 2.0 de las secuencias que corresponderían a la traducción de la proteína sm. Se observa una región altamente conservada entre los aminoácidos 30 y 63 la cual es rica en serinas (recuadro azul). En el extremo carboxilo terminal se encuentran varios aminoácidos conservados entre los cuales hay varias leucinas (recuadros rojos) las cuales podrían ser importantes en interacciones proteicas.

Se uso el software de expasy protparam (25) para realizar el análisis de la secuencia de aminoácidos. Entre los aminoácidos de la proteína sm de HAsV-8, aquellos con mayor presencia son leucinas (14.3%), las cuales son importantes en interacciones entre proteínas, siguiéndole los aminoácidos polares como glutamina (12.5%), asparagina (8.0%) y serina

(8.0%). Además de la proporción de los aminoácidos, el índice promedio de hidropaticidad (GRAVY) de la proteína es de -0.454 lo cual es característico de una proteína soluble.

Una característica de proteínas virales implicadas en interacciones con proteínas del huésped es la presencia de pequeñas regiones desordenadas. Estas regiones son aquellas que no cuentan con una estructura terciaria fija, las cuales les dan la capacidad de interactuar con gran variedad de proteínas celulares (74). Para saber si la proteína sm contaba con regiones desordenadas se utilizó el software swiss model combinando dos diferentes programas para análisis *in silico* de proteínas PSIPREP y DISOPRED. PSIPRED es utilizado para predecir estructuras secundarias en una secuencia de aminoácidos en base a la homología con secuencias con estructura conocida (41). El programa DISOPRED predice el grado de desorden de una proteína basándose en la homología que presentan con secuencias de aminoácidos que pierden su localización atómica en un espectro electromagnético, generado al determinar la estructura por rayos X de una proteína cristalizada (80). En este programa se introdujo la secuencia de aminoácidos de sm de HAstV-8. Como se puede observar, la proteína tiene pequeñas regiones desordenadas entre los aminoácidos 20-50 y 80-100, además podemos ver que tiene varias regiones de estructura coil y una alfa hélice hacia el extremo carboxilo terminal (Fig. 24).

Para que un virus pueda mantenerse viable en el interior del huésped durante todo su ciclo replicativo es necesario que este contienda con los mecanismos de defensa del huésped, además de que pueda aprovechar la maquinaria celular para su proliferación. Las proteínas virales han evolucionado en base a esta relación, generando una gran cantidad de interacciones con proteínas celulares en una misma proteína. Generalmente, entre las características que muestran son pequeñas regiones desordenadas que se encuentran

flanqueadas por estructuras coil para permitir gran flexibilidad para interaccionar (74). La flexibilidad intrínseca que las proteínas presentan, debido al grado de desorden de las regiones que las conforman, tiene como resultado un área lo suficientemente accesible para interacciones y modificaciones post-transcripcionales, además de permitir cambios conformacionales que pueden inducir la unión con una amplia variedad de proteínas. Dado que la secuencia de aminoácidos de sm muestra estas características, al menos in silico, es probable que sea partícipe de funciones sobre la maquinaria del huésped.

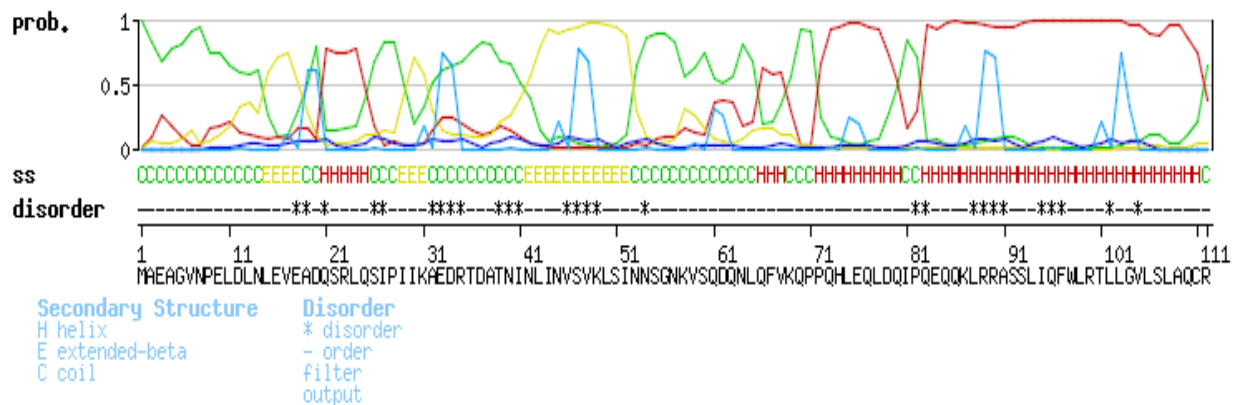


Figura 24: Estructura secundaria y grado de desorden predicho para la proteína sm de HAstV-8. La secuencia correspondiente a la proteína sm fue analizada con el software swiss model que conjunta dos programas: PSIPREP y DISOPREP, los cuales predicen la estructura secundaria y el grado de desorden de una proteína por su secuencia de aminoácidos. Se muestran abajo la nomenclatura utilizada para alfa hélices (H), hojas beta (E), estructura coil (C) y regiones desordenadas (*).

Se realizaron alineamientos de la secuencia de aminoácidos para encontrar similitudes con otras proteínas. Sin embargo, a pesar de variar los algoritmos y las condiciones que nos permite el programa Protein Blast 2.0 para dar una mayor flexibilidad

a la búsqueda, los e-value obtenidos fueron muy grandes como para ser tomados en cuenta (>0.32) (47).

A pesar de no tener parecido con alguna proteína reportada, la secuencia de aminoácidos tiene una gran cantidad de serinas en una región altamente conservada entre los serotipos humanos. Las serinas pueden ser un blanco de fosforilación por cinasas celulares, y esta modificación podría ser usada como detonante del cambio conformacional de una proteína modulando posibles interacciones con DNA, RNA u otra proteína. Usando el programa NetPhosK se determinó la posibilidad de que un aminoácido sea fosforilado en la proteína sm, esto en base a la comparación con sitios de fosforilación específicos de familias de cinasas otorgando un valor a cada aminoácido. Este valor (score) determina la similitud con la que se relaciona con cada familia, disminuyendo la posibilidad de falsos negativos conforme el número es mayor (10).

Method: NetPhosK without ESS filtering:

Query: Sequence

Site	Kinase	Score
S-25	RSK	0.62
S-25	PKC	0.53
S-25	PKA	0.58
S-46	PKC	0.66
S-50	PKA	0.55
S-59	DNAPK	0.51
S-59	ATM	0.58
S-91	RSK	0.53
S-91	PKA	0.86
S-91	PKG	0.63
S-92	RSK	0.52
S-92	PKC	0.74
S-92	PKA	0.73

Highest Score: 0.86 PKA at position 91

Tabla 1: Posibles sitios de fosforilación presentes en la proteína sm de HAstV-8. La secuencia de aminoácidos correspondientes a la traducción del ORF3 de HAstV-8 se introdujo en el programa NetPhosK para determinar posibles sitios de fosforilación. Los score indican la probabilidad de que el aminoácido indicado pertenezca a una posible familia de sitios de fosforilación. La proteína presentó posibles sitios de fosforilación para las enzimas ribosomal s6 kinasa (RSK), protein kinasa C (PKC), ciclin AMP dependent protein kinasa (PKA), DNA-dependent protein kinase (DNAPK), Ataxia telangiectasia mutated (ATM) y proteína kinasa G (PKG).

Se identificaron 13 posibles sitios de fosforilación a lo largo de toda la proteína. Los score mayores se observaron en la serina en posición 91 para la cinasa PKA (0.86) y en la posición 92 para las cinasas PKA (0.73) y PKC (0.74) (Tab. 1). La serina en posición 91 sólo está conservada en los serotipos 1, 4, 6 y 8, sin embargo, la serina 92 se encuentra conservada en los 8 serotipos de HAstV (Fig. 23) por lo que podría ser importante dado el grado de prevalencia de este aminoácido en esta posición.

7.3. _ La proteína sm se expresa durante la infección por Astrovirus.

El análisis *in silico* de la proteína sm, reveló posibles sitios de fosforilación además de características propias de proteínas virales que participan en interacciones con gran variedad de proteínas virales y celulares, sugiriendo alguna posible función dentro del ciclo replicativo viral. Para probar que la proteína sm fuese expresada durante la infección viral se generaron anticuerpos de conejo dirigidos contra un péptido expresado en *Escherichia coli* a partir de un plásmido que contenía la región correspondiente al ORFX de HAstV-8. Este anticuerpo fue usado para teñir por inmunofluorescencia células infectadas con HAstV serotipo 1 y 8. Las células fueron teñidas usando este anticuerpo, por lo que posiblemente el ORFX sea traducido en células infectadas (Fig. 25). A pesar de observar a la proteína por inmunofluorescencia, no se pudo detectarla por Western blot (datos no mostrados), probablemente debido a problemas con el anticuerpo utilizado o a que la proteína sea inestable y se degrade durante el tratamiento de la muestra previo al Western blot.

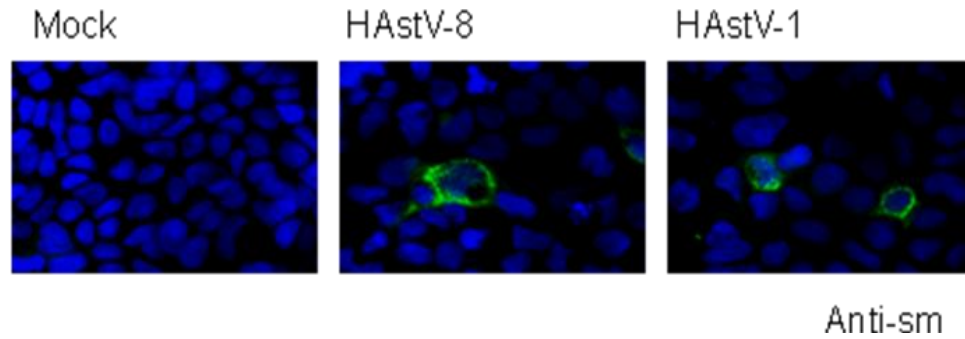


Figura 25: La proteína sm es expresada en células Caco-2 infectadas con HAstV. Células Caco-2 se infectaron con HAstV serotipos 8 y 1 a una moi de 0.1, y procesadas para inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo primario anti-sm dirigido contra la proteína traducida por el ORFX. Como control se utilizaron células sin infectar (mock).

7.4. _Análisis de la mutante pAVIC-T₄₃₇₅C.

Para evaluar la importancia de la proteína sm en el contexto de una infección en células de cultivo, se evaluó la infectividad de una clona que contenía un cambio en el nucleótido T 4375 por C (pAVIC-T₄₃₇₅C) cambiando el codón de inicio Metionina (Met) por Treonina (Thr), para evitar la traducción de sm durante la infección (Fig. 26). Esta mutación es silenciosa en la traducción del ORF2 ya que se cambia el codón AAT por AAC los cuales traducen para el mismo aminoácido asparagina (Asn) en este marco de lectura, asegurando que cualquier cambio fenotípico sea debido a la mutación en el ORFX.

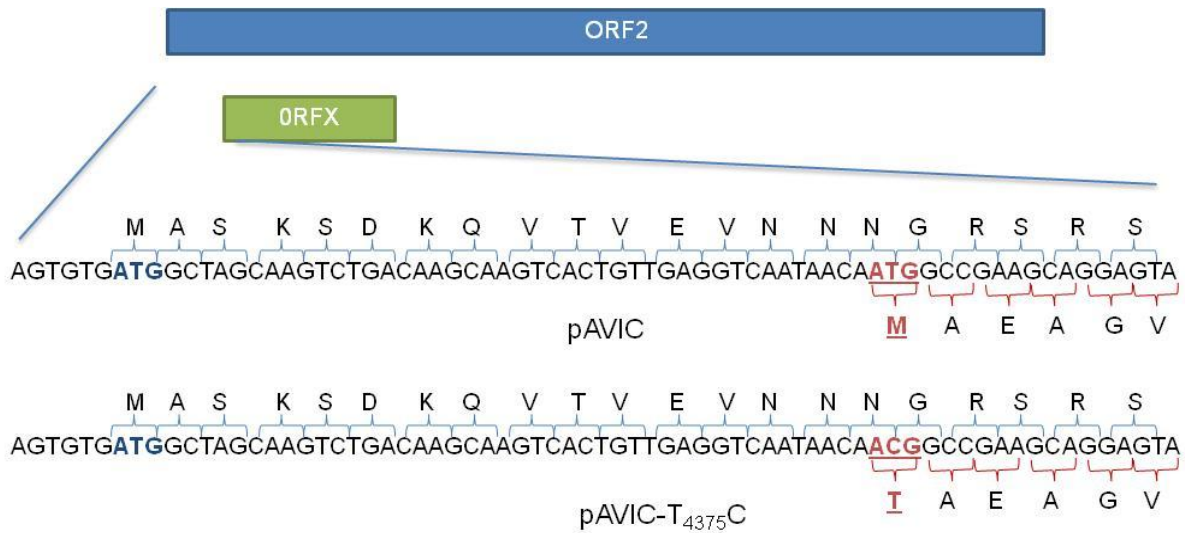


Figura 26: Generación de la mutante del ORFX. La clona pAVIC-T₄₃₇₅C fue provista por Suzane Matsui (Stanford University). Esta clona contiene una mutación en el nucleótido 4375 sustituyendo el condón de inicio ATG del ORFX (letras rojas subrayadas) por ACG el cual codifica para Treonina (**I**). Esta mutación no afecta el ORF2 ya que el cambio en el codón en este marco de lectura es AAT a AAC, codificando ambos para Asparagina. Este codón se encuentra 45 nucleótidos corriente abajo del codón de inicio del ORF2 (letras azules). Se encuentran marcados los codones del ORF2 (corchetes azules) y los del ORFX (corchetes rojos), así como los aminoácidos que codifican.

Se hizo transcripción *in vitro* de pAVIC-T₄₃₇₅C y el RNA obtenido se utilizó para transfectar células Huh7.5.1 utilizando las condiciones previamente descritas. Las células transfectadas fueron cosechadas a diferentes tiempos post-transfección y los rendimientos de la fracción intra y extracelular fueron calculados en células Caco-2. Como punto de comparación se transfectó a la par RNA de la clona silvestre y Mc-RNA como control negativo. Las células transfectadas con los diferentes RNA se tiñeron por inmunofluorescencia utilizando como anticuerpo primario anti-HAstV-1. Tanto las células transfectadas con RNA obtenido de pAVIC como de la mutante pAVIC-T₄₃₇₅C fueron positivas, indicando la correcta traducción de las proteínas estructurales (Fig. 27a). Así

mismo en ambos casos el rendimiento de las fracciones intracelular y extracelular fueron similares (Fig. 27b, Fig. 27c). Esto implica que la síntesis de la proteína no parece ser esencial para la replicación del virus en cultivos celulares, sin embargo también podría ser que el fenotipo no se haya modificado por la aparición de mutaciones revertantes o supresoras.

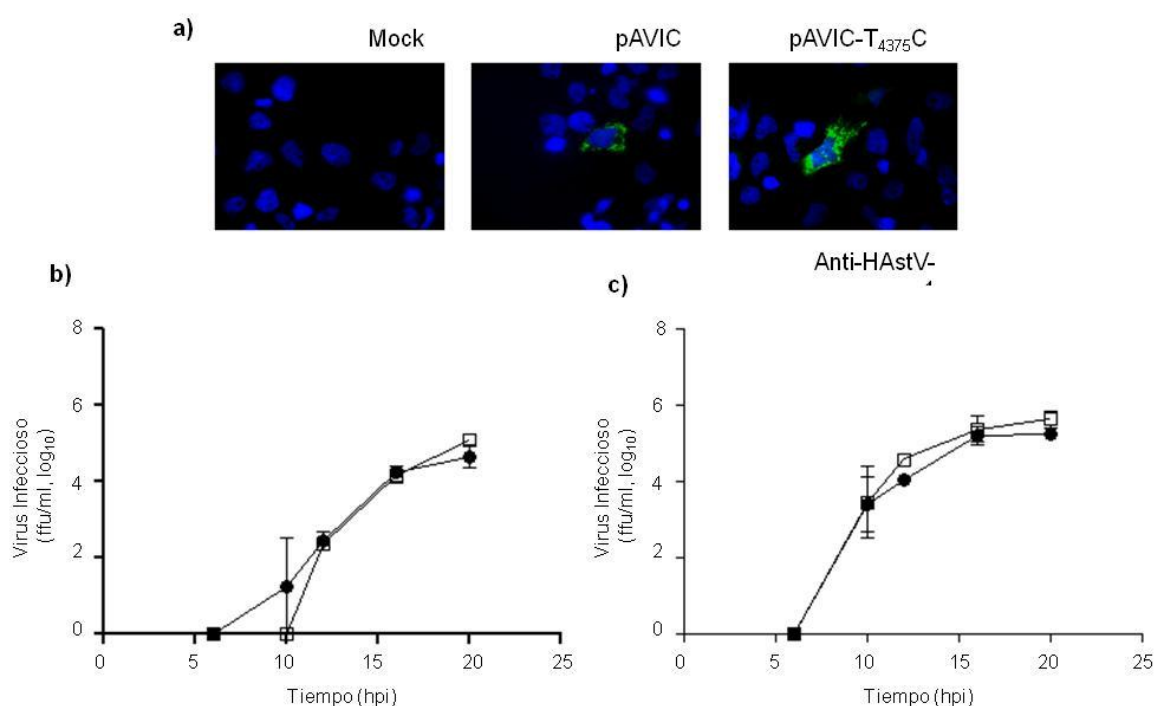


Figura 27: La mutante pAVIC-T₄₃₇₅C muestra un fenotipo igual al WT. RNA transcrito in vitro a partir de la clona pAVIC y pAVIC-T₄₃₇₅C fue transfectado en células Huh7.5.1. Las células transfectadas se procesaron para inmunofluorescencia usando como anticuerpo primaria anti-HAStV-1 (a). Las células fueron cosechadas a las 20h post-transfección y los rendimientos virales de la fracción intracelular (b) o extracelular (c) se obtuvieron infectando células Caco-2. pAVIC (círculos cerrados), pAVIC-T₄₃₇₅C (cuadrados abiertos).

Para comprobar que la similitud en la replicación viral no sea debido al surgimiento de revertantes, el RNA de las partículas virales en la fracción extracelular fue extraído y

amplificado en cDNA por RT-PCR con los oligonucleótidos específicos, generando un fragmento que va desde el nucleótido 4024 al 4710, el cual fue secuenciado. La secuencia anterior fue comparada con la secuencia obtenida de la clona pAVIC-T₄₃₇₅C utilizando los mismos oligos, comprendiendo la región desde el nucleótido 3858 al 4734. En esta región no se encontró ningún cambio entre las dos secuencias a un ciclo replicativo, conservándose la mutación introducida, por lo que no se encontraron revertantes, sin embargo cabe la posibilidad de que se hayan generado mutaciones supresoras dado que no se secuenció el genoma completo.

Otra posibilidad es que la función de esta proteína no sea importante para la infección, en cultivo celular. Lo anterior se ha llegado a observar para HEV con la proteína del ORF3, NSP6 de rotavirus y la proteína F de HCV. De estos tres virus aquel con mayor similitud tanto estructural como de composición del genoma con HAstV es HEV. HEV es un virus no envuelto que tiene un genoma de cadena sencilla y polaridad positiva de 7.2 Kb. Su genoma está conformado por tres marcos de lectura ORF1, ORF2 y ORF3. Recientemente se encontró una gran homología estructural entre la proteína VP25 de HAstV y la proteína CP de HEV, ambas conformando las espículas de las partículas virales (18). Este virus, como se mencionó anteriormente, traduce una pequeña proteína de 123 aminoácidos a partir del marco de lectura 3 que se encuentra dentro del marco de lectura 2 en el RNA subgenómico. La secuencia primaria de esta proteína a pesar de no tener homología con dominios ya conocidos, contiene características únicas como regiones hidrofóbicas y desordenadas, además de ser una proteína rica en dominios de prolinas, útiles en interacción proteína-proteína (2). Esta proteína podría ser un ejemplo de lo que pasa con la sm de astrovirus durante la infección. La proteína del ORF3 se reportó que no

es indispensable durante la infección de células huésped (19) sin embargo, es requerida para la infección en organismos completos (30), además de tener un gran número de interacciones con proteínas celulares. Dadas las similitudes que se han encontrado entre los dos virus, y además la existencia de regiones en sm que podrían definir un gran número de interacciones proteína-proteína, puede ser que exista la posibilidad de que sm tenga un papel similar durante la infección en organismos completos.

8._ CONCLUSIONES:

Se observó que las células Huh7.5.1 son menos susceptibles a la infección por astrovirus en comparación con las células Caco-2 debido a que el título viral en esas células es aproximadamente dos logaritmos menor. Sin embargo, el rendimiento de partículas infecciosas fue similar, ya sea al infectar con la misma cantidad de lisado celular o con la misma *moi* en las dos líneas celulares siendo más permisivas las células Huh7.5.1. Por otro lado, las células Hek-293 además de generar rendimientos menores, el virus producido no fue liberado, corroborando con la falta de procesamiento de la proteína estructural. Por los resultados anteriores las células Huh7.5.1 se usaron para optimizar el método de genética reversa. Al realizar la transfección de RNA viral en células los títulos virales alcanzados por los lisados celulares son de alrededor de 10^7 y 10^8 ffu/ml. El procesamiento de las proteínas estructurales y no estructurales en esta línea celular, se observó tanto en la infección como en la transfección, así como, la liberación de virus. Para fines prácticos estos resultados son convenientes ya que aunque la finalidad del trabajo no es evaluar el procesamiento de las proteínas virales durante la infección, nos da un indicativo de que posiblemente éste sea muy similar en estas células al ocurrido en Caco-2, por lo que en un futuro podrían ser usadas no sólo para el rescate de partículas infecciosas a partir de RNA, sino también para el estudio de las etapas del ciclo replicativo, posteriores a la entrada.

El principal objetivo del proyecto era que la transfección con RNA viral en células Huh7.5.1 produjera partículas infecciosas a un ciclo de replicación, con un título suficiente para que el fenotipo resultante de cualquier cambio producto de la manipulación de la clona

sea evidente. De esta forma, la transfección con RNA obtenido de células infectadas generó un rendimiento parecido a la infección en Caco-2 a una *moi* alta, esto a un ciclo de replicación. Luego de probar varios parámetros, tenemos que utilizando 5µg de RNA de células infectadas para transfectar 4×10^6 células y cosechando a las 16 horas obtenemos buenos rendimientos que se mantienen inclusive al utilizar más RNA o células.

El rendimiento obtenido por la transfección con RNA transcrito *in vitro* de pAVIC fue inferior al obtenido de una infección de células Caco-2; sin embargo, el título obtenido es suficiente para valorar el fenotipo de los cambios introducidos en la clona infecciosa, además de que es superior al obtenido usando las células BHK-21. Aún más, el hecho de que todo se haya establecido a un ciclo de replicación y no se den reinfecciones sucesivas disminuye la posibilidad de mutaciones que reviertan el fenotipo que se desee investigar como se vió usando la clona pAVICT_{4375C}.

Las condiciones de transfección antes mencionadas, fueron utilizadas para estudiar parcialmente la función de la proteína sm traducida a partir del ORF3 de HAstV. Los resultados obtenidos usando la clona pAVICT_{4375C}, sugieren que el ORF3 no es esencial para el virus en cultivos celulares, sin embargo, se requieren más experimentos para confirmar esta posibilidad.

9._ PERSPECTIVAS:

Una vez que se optimizó el método de genética reversa para HAstV-1, éste se usó para tratar de establecer el papel de la proteína sm de astrovirus durante la infección. Sin embargo, el estudio del efecto de mutaciones dirigidas nos permite verificar la importancia de cada una de las regiones del genoma. Entre los intereses de nuestro laboratorio se encuentran:

- Determinar el papel de los 4 sitios de corte por caspasas en la proteína estructural VP90. De entre todos ellos, el corte en el sitio TYVD₆₅₇ genera el producto final de 70kb (60), sin embargo no se conoce si los sitios de corte EETD₆₇₂, DEVD₆₈₆ y VEND₇₀₄ se dan durante la infección y si tienen alguna relevancia para en el ciclo replicativo viral. Mutando cada uno de estos sitios para evitar el corte por caspasas es posible analizar la importancia de cada uno.
- Determinar cuales son los sitios de la proteína en donde se lleva a cabo el procesamiento por la proteasa viral. Dado que ahora se conoce que la proteasa viral corta en aminoácidos ácidos (72), el único posible sitio reportado es en el aminoácido Glu624, sin embargo en las regiones de la proteína cercanas a la los sitios anteriormente propuestos se encuentran aminoácidos ácidos conservados. Ejemplos de lo anterior son los aminoácidos Asp412, Asp393 y Glu390 que se encuentran cerca del anteriormente reportado Val409 (26).

- Ver como afecta la replicación viral cambios en aminoácidos correspondientes a la región aminoterminal de la proteína estructural, los que se piensa son importantes para la interacción con el genoma viral durante la replicación (28).
- Determinar los sitios de la proteína estructural responsables de la interacción con el receptor celular durante la entrada del virus a la célula. Dado que se han cristalizado las proteínas que forman las espículas de astrovirus se propusieron varios dominios que podrían tener esta función (18).

En el caso de la proteína sm de astrovirus, aún falta determinar si es generada en las partículas mutantes. Además si éste no fuera el caso, falta secuenciar el resto del genoma viral, para descartar la existencia de mutaciones compensatorias. Para determinar si la proteína pudiera ser necesaria en una infección *in vivo*, faltaría generar un sistema de estudio donde se utilicen organismos completos donde se pueda usar la mutante generada. Sin embargo, a la fecha no existe ningún sistema descrito para HAstV, aunque podría ser posible utilizar quimeras de astrovirus de ratón con proteínas de HAstV, aplicando el sistema de genética inversa para este astrovirus.

10. BIBLIOGRAFÍA:

1. **Agol, V. I., A. V. Paul, and E. Wimmer.** 1999. Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Res* **62**:129-47.
2. **Ahmad, I., R. P. Holla, and S. Jameel.** 2011. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res* **161**:47-58.
3. **Al-Mutairy, B., J. E. Walter, A. Pothen, and D. K. Mitchell.** 2005. Genome prediction of putative genome-linked viral protein (VPg) of astroviruses. *Virus Genes* **31**:21-30.
4. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, M. D. D., J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhla.** 1999. *Current protocols in molecular biology*, vol. 2. Wiley Interscience, New York.
5. **Banos-Lara Mdel, R., and E. Mendez.** 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**:322-32.
6. **Bartenschlager, R., and T. Pietschmann.** 2005. Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a difference the host cell makes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9739-40.
7. **Bass, D. M., and U. Upadhyayula.** 1997. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. *J Virol* **71**:8666-71.
8. **Belliot, G., H. Laveran, and S. S. Monroe.** 1997. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch Virol* **142**:1323-34.

9. **Belliot, G., H. Laveran, and S. S. Monroe.** 1997. Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection. *J Med Virol* **51**:101-6.
10. **Blom, N., T. Sicheritz-Ponten, R. Gupta, S. Gammeltoft, and S. Brunak.** 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**:1633-49.
11. **Blomstrom, A. L., F. Widen, A. S. Hammer, S. Belak, and M. Berg.** 2010. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol* **48**:4392-6.
12. **Bosch, A., S. Guix, N. K. Krishna, E. Mendez, S. S. Monroe, M. Patin-Jackwood, and S. Schultz-Cherry.** 2012. *Astroviruses*. Elsevier, San Diego.
13. **Brinker, J. P., N. R. Blacklow, and J. E. Herrmann.** 2000. Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines. *Arch Virol* **145**:1847-56.
14. **Burnett, W. V.** 1997. Northern blotting of RNA denatured in glyoxal without buffer recirculation. *Biotechniques* **22**:668-71.
15. **Chaudhry, Y., A. Nayak, M. E. Bordeleau, J. Tanaka, J. Pelletier, G. J. Belsham, L. O. Roberts, and I. G. Goodfellow.** 2006. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J Biol Chem* **281**:25315-25.
16. **Chu, D. K., L. L. Poon, Y. Guan, and J. S. Peiris.** 2008. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J Virol* **82**:9107-14.
17. **Dennehy, P. H., S. M. Nelson, S. Spangenberg, J. S. Noel, S. S. Monroe, and R. I. Glass.** 2001. A prospective case-control study of the role of astrovirus in acute diarrhea among hospitalized young children. *J Infect Dis* **184**:10-5.

18. **Dong, J., L. Dong, E. Mendez, and Y. Tao.** 2011. Crystal structure of the human astrovirus capsid spike. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:12681-6.
19. **Emerson, S. U., H. Nguyen, U. Torian, and R. H. Purcell.** 2006. ORF3 protein of hepatitis E virus is not required for replication, virion assembly, or infection of hepatoma cells in vitro. *J Virol* **80**:10457-64.
20. **Finkbeiner, S. R., L. R. Holtz, Y. Jiang, P. Rajendran, C. J. Franz, G. Zhao, G. Kang, and D. Wang.** 2009. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Virol J* **6**:161.
21. **Finkbeiner, S. R., C. D. Kirkwood, and D. Wang.** 2008. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *Virol J* **5**:117.
22. **Finkbeiner, S. R., Y. Li, S. Ruone, C. Conrardy, N. Gregoricus, D. Toney, H. W. Virgin, L. J. Anderson, J. Vinje, D. Wang, and S. Tong.** 2009. Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *J Virol* **83**:10836-9.
23. **Firth, A. E., and J. F. Atkins.** 2010. Candidates in Astroviruses, Seadornaviruses, Cytorhabdoviruses and Coronaviruses for +1 frame overlapping genes accessed by leaky scanning. *Virol J* **7**:17.
24. **Gallimore, C. I., C. Taylor, A. R. Gennery, A. J. Cant, A. Galloway, D. Lewis, and J. J. Gray.** 2005. Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J Clin Microbiol* **43**:3890-4.

25. **Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. Appel, and A. Bairoch.** 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Humana Press
26. **Geigenmuller, U., T. Chew, N. Ginzton, and S. M. Matsui.** 2002. Processing of nonstructural protein 1a of human astrovirus. *J Virol* **76**:2003-8.
27. **Geigenmuller, U., N. H. Ginzton, and S. M. Matsui.** 1997. Construction of a genome-length cDNA clone for human astrovirus serotype 1 and synthesis of infectious RNA transcripts. *J Virol* **71**:1713-7.
28. **Geigenmuller, U., N. H. Ginzton, and S. M. Matsui.** 2002. Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. *J Gen Virol* **83**:1691-5.
29. **Goodfellow, I., Y. Chaudhry, I. Gioldasi, A. Gerondopoulos, A. Natoni, L. Labrie, J. F. Laliberte, and L. Roberts.** 2005. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep* **6**:968-72.
30. **Graff, J., H. Nguyen, C. Yu, W. R. Elkins, M. St Claire, R. H. Purcell, and S. U. Emerson.** 2005. The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J Virol* **79**:6680-9.
31. **Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn.** 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**:59-74.
32. **Grudzien, E., J. Stepinski, M. Jankowska-Anyszka, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz, and R. E. Rhoads.** 2004. Novel cap analogs for in vitro synthesis of mRNAs with high translational efficiency. *RNA* **10**:1479-87.

33. **Guerrero, M. L., J. S. Noel, D. K. Mitchell, J. J. Calva, A. L. Morrow, J. Martinez, G. Rosales, F. R. Velazquez, S. S. Monroe, R. I. Glass, L. K. Pickering, and G. M. Ruiz-Palacios.** 1998. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr Infect Dis J* **17**:723-7.
34. **Guix, S., A. Bosch, and R. M. Pinto.** 2005. Human astrovirus diagnosis and typing: current and future prospects. *Lett Appl Microbiol* **41**:103-5.
35. **Guix, S., S. Caballero, A. Bosch, and R. M. Pinto.** 2005. Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication. *Virology* **333**:124-31.
36. **Guix, S., S. Caballero, C. Villena, R. Bartolome, C. Latorre, N. Rabella, M. Simo, A. Bosch, and R. M. Pinto.** 2002. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol* **40**:133-9.
37. **Hamera, S., X. Song, L. Su, X. Chen, and R. Fang.** 2012. Cucumber Mosaic Virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J* **69**:104-15.
38. **Herbert, T. P., I. Brierley, and T. D. Brown.** 1997. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol* **78 (Pt 5)**:1033-40.
39. **Jiang, B., S. S. Monroe, E. V. Koonin, S. E. Stine, and R. I. Glass.** 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**:10539-43.
40. **Jonassen, C. M., T. T. Jonassen, T. M. Sveen, and B. Grinde.** 2003. Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. *Virus Res* **91**:195-201.

41. **Jones, D. T.** 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* **292**:195-202.
42. **Kapoor, A., L. Li, J. Victoria, B. Oderinde, C. Mason, P. Pandey, S. Z. Zaidi, and E. Delwart.** 2009. Multiple novel astrovirus species in human stool. *J Gen Virol* **90**:2965-72.
43. **Kiang, D., and S. M. Matsui.** 2002. Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural protein. *J Gen Virol* **83**:25-34.
44. **Kobe, B., and J. Deisenhofer.** 1994. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* **19**:415-21.
45. **Krishna, N. K.** 2005. Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. *Viral Immunol* **18**:17-26.
46. **Kurtz, J. B., and T. W. Lee.** 1987. Astroviruses: human and animal. *Ciba Found Symp* **128**:92-107.
47. **Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins.** 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**:2947-8.
48. **Lewis, D. C., N. F. Lightfoot, W. D. Cubitt, and S. A. Wilson.** 1989. Outbreaks of astrovirus type 1 and rotavirus gastroenteritis in a geriatric in-patient population. *J Hosp Infect* **14**:9-14.
49. **Lewis, T. L., H. B. Greenberg, J. E. Herrmann, L. S. Smith, and S. M. Matsui.** 1994. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. *J Virol* **68**:77-83.

50. **Li, H., W. X. Li, and S. W. Ding.** 2002. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* **296**:1319-21.
51. **Liljestrom, P., S. Lusa, D. Huylebroeck, and H. Garoff.** 1991. In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. *J Virol* **65**:4107-13.
52. **Lowe, S. W., and H. E. Ruley.** 1993. Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev* **7**:535-45.
53. **Marriott, A. C., and N. J. Dimmock.** 2010. Defective interfering viruses and their potential as antiviral agents. *Rev Med Virol* **20**:51-62.
54. **Martin, M. E., and A. J. Berk.** 1998. Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J Virol* **72**:3146-54.
55. **Mendez-Toss, M., P. Romero-Guido, M. E. Munguia, E. Mendez, and C. F. Arias.** 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *J Gen Virol* **81**:2891-7.
56. **Mendez, E.** Resultados no Publicados.
57. **Mendez, E., G. Aguirre-Crespo, G. Zavala, and C. F. Arias.** 2007. Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. *J Virol* **81**:10649-58.
58. **Méndez, E., and C. Arias.** 2006. *Astroviruses*, Fifth ed, vol. 1. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. .
59. **Mendez, E., T. Fernandez-Luna, S. Lopez, M. Mendez-Toss, and C. F. Arias.** 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J Virol* **76**:7996-8002.

60. **Mendez, E., E. Salas-Ocampo, and C. F. Arias.** 2004. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J Virol* **78**:8601-8.
61. **Mendez, E., M. P. Salas-Ocampo, M. E. Munguia, and C. F. Arias.** 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *J Virol* **77**:11378-84.
62. **Monroe, S. S.** 2003. *Molecular epidemiology of human astroviruses.*, vol. 9. Elsevier, Amsterdam.
63. **Monroe, S. S., S. E. Stine, L. Gorelkin, J. E. Herrmann, N. R. Blacklow, and R. I. Glass.** 1991. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. *J Virol* **65**:641-8.
64. **Naficy, A. B., M. R. Rao, J. L. Holmes, R. Abu-Elyazeed, S. J. Savarino, T. F. Wierzbza, R. W. Frenck, S. S. Monroe, R. I. Glass, and J. D. Clemens.** 2000. Astrovirus diarrhea in Egyptian children. *J Infect Dis* **182**:685-90.
65. **Pasquinelli, A. E., J. E. Dahlberg, and E. Lund.** 1995. Reverse 5' caps in RNAs made in vitro by phage RNA polymerases. *RNA* **1**:957-67.
66. **Quan, P. L., T. A. Wagner, T. Briese, T. R. Torgerson, M. Hornig, A. Tashmukhamedova, C. Firth, G. Palacios, A. Baisre-De-Leon, C. D. Paddock, S. K. Hutchison, M. Egholm, S. R. Zaki, J. E. Goldman, H. D. Ochs, and W. I. Lipkin.** 2010. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg Infect Dis* **16**:918-25.
67. **Rainsford, E. W., and M. A. McCrae.** 2007. Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. *Virus Res* **130**:193-201.

68. **Rehwinkel, J., and C. Reis e Sousa.** 2010. RIGorous detection: exposing virus through RNA sensing. *Science* **327**:284-6.
69. **Rivera, R., H. H. Nollens, S. Venn-Watson, F. M. Gulland, and J. F. Wellehan, Jr.** Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. *J Gen Virol* **91**:166-73.
70. **Russell, R. S., J. C. Meunier, S. Takikawa, K. Faulk, R. E. Engle, J. Bukh, R. H. Purcell, and S. U. Emerson.** 2008. Advantages of a single-cycle production assay to study cell culture-adaptive mutations of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:4370-5.
71. **Sedman, S. A., G. W. Gelembiuk, and J. E. Mertz.** 1990. Translation initiation at a downstream AUG occurs with increased efficiency when the upstream AUG is located very close to the 5' cap. *J Virol* **64**:453-7.
72. **Speroni, S., J. Rohayem, S. Nenci, D. Bonivento, I. Robel, J. Barthel, V. B. Luzhkov, B. Coutard, B. Canard, and A. Mattevi.** 2009. Structural and biochemical analysis of human pathogenic astrovirus serine protease at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* **387**:1137-52.
73. **Todd, D., V. J. Smyth, N. W. Ball, B. M. Donnelly, M. Wylie, N. J. Knowles, and B. M. Adair.** 2009. Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as astroviruses. *Avian Pathol* **38**:21-30.
74. **Tokuriki, N., C. J. Oldfield, V. N. Uversky, I. N. Berezovsky, and D. S. Tawfik.** 2009. Do viral proteins possess unique biophysical features? *Trends Biochem Sci* **34**:53-9.

75. **Unicomb, L. E., N. N. Banu, T. Azim, A. Islam, P. K. Bardhan, A. S. Faruque, A. Hall, C. L. Moe, J. S. Noel, S. S. Monroe, M. J. Albert, and R. I. Glass.** 1998. Astrovirus infection in association with acute, persistent and nosocomial diarrhea in Bangladesh. *Pediatr Infect Dis J* **17**:611-4.
76. **Vassilaki, N., and P. Mavromara.** 2009. The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life* **61**:739-52.
77. **Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T. J. Liang.** 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**:791-6.
78. **Walter, J. E., J. Briggs, M. L. Guerrero, D. O. Matson, L. K. Pickering, G. Ruiz-Palacios, T. Berke, and D. K. Mitchell.** 2001. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Arch Virol* **146**:2357-67.
79. **Wang, Q. H., J. Kakizawa, L. Y. Wen, M. Shimizu, O. Nishio, Z. Y. Fang, and H. Ushijima.** 2001. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. *J Med Virol* **64**:245-55.
80. **Ward, J. J., J. S. Sodhi, L. J. McGuffin, B. F. Buxton, and D. T. Jones.** 2004. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol* **337**:635-45.
81. **Willcocks, M. M., T. D. Brown, C. R. Madeley, and M. J. Carter.** 1994. The complete sequence of a human astrovirus. *J Gen Virol* **75 (Pt 7)**:1785-8.

82. **Yu, M., Y. Tang, M. Guo, Q. Zhang, and Y. M. Saif.** 2000. Characterization of a small round virus associated with the poult enteritis and mortality syndrome. *Avian Dis* **44**:600-10.

Anexo: *Alternative cells lines to improve the rescue of infectious human astrovirus from a cDNA clone.*



Alternative cell lines to improve the rescue of infectious human astrovirus from a cDNA clone

Rodrigo Velázquez-Moctezuma, Ma. del Rocío Baños-Lara¹, Yunuén Acevedo, Ernesto Méndez*

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

A B S T R A C T

Article history:

Received 30 August 2011
Received in revised form 3 November 2011
Accepted 9 November 2011
Available online 18 November 2011

Keywords:

Astrovirus
Infectious clone
Huh7.5.1 cells
Reverse genetics

A reverse genetics system for human astrovirus (HAstV) was established previously; however, it has not been exploited mainly because cells used for virus packaging are not permissive, requiring several rounds of replication to obtain acceptable infectious virus. In this work, in the search for alternative permissive cell lines to be used as packaging cells, Hek-293 and Huh7.5.1 were tested. Given that HAstV infection in Hek-293 showed differences with that in Caco-2, the gold standard for HAstV growth but scarcely transfectable, and it was more similar to that observed in the hepatoma Huh7.5.1 cell line, these last cells were further used to transfect viral RNA. Virus titers near to 10^8 infectious particles per ml (ffu/ml) were obtained at 16–20 h after transfection with RNA from infected cells. However, virus titers close to 10^6 ffu/ml were obtained by using *in vitro* transcribed RNA from a cDNA HAstV-1 clone. In contrast, virus recovery in BHK-21, reported previously as the packaging cells, from this RNA was of about 10^4 ffu/ml, two logarithms less than in Huh7.5.1. Apparently, the 5'-end modification of the viral RNA determined its specific infectivity, since virus recovery was abolished when the total RNA was treated with proteinase-K, probably by removing a protein-linked genome protein, but it increased when capping of the *in vitro* transcribed RNA was more efficient. Thus, an alternative and more efficient reverse genetics system for HAstV was established by using Huh7.5.1 cells.

© 2011 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Human astroviruses (HAstV) represent one of the most frequent agents causing diarrhea in young children, immunocompromized patients and the elderly (Mendez and Arias, 2007). Eight serotypes of astroviruses isolated from humans (HAstV-1 to HAstV-8) have been recognized; however, recent isolation of genetically diverse astroviruses from human, both intestinal (Finkbeiner et al., 2009; Kapoor et al., 2009) and extra-intestinal samples (Quan et al., 2010), and from mammals with nervous system infections (Blomstrom et al., 2010) suggests that astroviruses might be responsible for diseases other than gastrointestinal in mammals, confirming their medical and veterinary relevance. HAstVs have a positive single stranded RNA genome [ssRNA(+)] with three open reading frames flanked by two non-translated regions (NTR) in the order 5'-NTR-ORF1a-ORF1b-ORF2-NTR-3' (Jiang et al., 1993), with overlapping

sequences between ORFs. The nonstructural proteins that includes a viral protease (V-Pro) and a RNA-polymerase RNA-dependent (RdRp) are synthesized from ORF1a and ORF1b (Geigenmuller et al., 2002a; Mendez et al., 2003), respectively, using the genome RNA as template, while the structural protein of 87–90 kDa is synthesized from a subgenomic RNA (sgRNA) that contains ORF2, produced after RNA replication (Monroe et al., 1993; Willcocks and Carter, 1993). As an ssRNA(+), the astrovirus genome is able to initiate a productive infection (Geigenmuller et al., 1997). *In vitro* transcribed RNA from a cDNA clone (named pAVIC) that represents the genome RNA of HAstV-1 (Oxford strain) has also been proved to be infectious (Geigenmuller et al., 1997); therefore, using this clone, and baby hamster kidney (BHK-21) and Caco-2 cells, a reverse genetics system for HAstV-1 was established (Geigenmuller et al., 1997) and used to analyze specific mutations in the structural (Geigenmuller et al., 2002b) and nonstructural proteins (Guix et al., 2005). This system consists in introducing the *in vitro* transcribed RNA into the highly transfectable but poorly permissive BHK-21 cells, harvesting the virus produced and propagate it in the permissive Caco-2 cells. This protocol has limitations due to the use of the poorly permissive BHK-21 cells that require the virus to be propagated subsequently in Caco-2 cells to reach acceptable titers. Although efficient in terms of yields, harvesting virus after several rounds of replication might provoke accumulation of mutations in the viral progeny that might

* Corresponding author at: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Colonia Miraval, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico. Tel.: +52 777 3291612; fax: +52 777 3291622.

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

¹ Present address: Department of Pathobiological Sciences, Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70803, USA.

emerge during adaptation. Thus, analysis of the phenotype associated with specific mutations introduced in the pAVIC clone may be prone to errors. In fact, viruses with changes, non-related with the original introduced mutations in the non-structural region, were found after virus recovery by this method (Guix et al., 2005).

To improve virus rescue from the pAVIC HAsV-1 cDNA clone and to avoid accumulation of selected mutants due to multiple replication cycles, in this work, alternative cell lines that are highly transfectable, and more permissive than BHK-21, were evaluated to obtain the highest virus yield at one replication cycle. This system would facilitate analysis of the rescued virus from cDNA clones with specific mutations, at one replication cycle.

2. Materials and methods

2.1. Cells and viruses

Human adenocarcinoma (Caco-2) and baby hamster kidney (BHK-21) cells from the American Type Culture Collection (ATCC) were used in this work. Human embryo kidney (Hek-293) cells were obtained from Dr. S. Castro (Instituto de Biotecnología-UNAM). Cell line Huh7.5.1 was derived from the human hepatoma cells Huh7 containing Hepatitis C virus replicons and infected with the same virus, after rounds of selection in the presence interferon-gamma (IFN- γ) (Sumpter et al., 2005; Zhong et al., 2005). All cell lines were grown in Dulbecco modified essential medium (DMEM) (Sigma, Cat. D777) supplemented with non-essential amino acid (Gibco, Cat. 1140) and 10% fetal bovine serum (FBS) (Cansera) at 37 °C and 10% CO₂ for 3–4 days. Viral stocks of HAsV-8 (Yuc8 strain) (Mendez-Toss et al., 2000) were prepared as described previously (Mendez et al., 2002) activating the virus with trypsin (Gibco, 1:250) at 200 μ g/ml, and infecting at a multiplicity of infection (moi) of 0.1. After cells inoculation and 1 h of attachment, the unbound virus was removed and cells were washed twice with minimal essential medium (MEM) and incubated at 37 °C for 20 h. Virus infectivity was determined by staining infected cells with an immunoperoxidase assay, using rabbit polyclonal anti-HAsV-8, as primary antibodies (Mendez et al., 2002). For HAsV-1 titration, an indirect immunofluorescent assay using anti-HAsV-1 (donated by Dr. D. Bass, Stanford University), as primary antibodies, was carried out.

2.2. Sera and reagents

Rabbit polyclonal sera to HAsV-8 and to a recombinant protein containing the viral protease domain (V-Pro) of HAsV-8 have been described previously (Mendez et al., 2002, 2003). Serum to HAsV-1 (Oxford strain) was produced against the purified virus (Bass and Upadhyayula, 1997) and it was kindly donated by D. Bass (Stanford University). Goat to rabbit polyclonal antibodies coupled to Alexa-488 (Molecular Probes, Cat. 11034), and protein-A coupled to horseradish peroxidase (Amersham, Cat. NA-9120V) were used as secondary reagents to detect infected cells, respectively.

2.3. Cellular RNA extraction

Caco-2 cells were infected with HAsV-8 at 0.1 moi, as described above, and incubated for 18 h. Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen, Cat. 15596-018), and precipitated with isopropanol, following the instructions of the manufacturer. Briefly, approximately 10⁶ cells were washed twice with RNase-free PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, and pH 7.4), lysed with 1 ml of Trizol and RNA extracted with 0.1 ml of chloroform. After vigorous agitation, the aqueous phase was recovered and the RNA was precipitated with isopropanol, and resuspended in RNase-free water. RNA was quantified, and its integrity was

confirmed in glyoxal denatured agarose gels (Burnett, 1997). RNA from mock-infected cells was also obtained to use it as control. When indicated, total RNA was treated with proteinase-K (final concentration 2 μ g/ μ l) (Invitrogen, Cat. 25530-049) or RNase-A (final concentration 200 μ g/ml) for 30 min at 37 °C, before use.

2.4. In vitro transcription of HAsV-1 genome RNA

The plasmid pAVIC that contains the full-length genome of HAsV-1, Oxford strain (Geigenmuller et al., 1997), was provided generously by Drs. S. Matsui and U. Geigenmuller (Stanford University, USA). pAVIC was linearized with XhoI (New-England Biolabs) and later used for *in vitro* transcription with Megascript (Cat. AM1334, Ambion Lab.) or MessageMAX T7 ARCA-Capped kit (Cat. MMA60710, Epicentre Biotechnologies), using the instructions of the manufacturers. RNA was cleaned up by precipitation with lithium chloride and ammonium acetate (MegaScript, and MessageMAX T7 ARCA, respectively).

2.5. Transfection of Huh7.5.1 and BHK-21 cells

Huh7.5.1 cells were trypsinized when they reached 70–80% confluence, resuspended in DMEM and centrifuged at 190 \times g for 10 min at room temperature; after removing the supernatant, cells were washed twice with cold PBS (RNase-free), and counted to dilute them with the same PBS to a final concentration of 1 \times 10⁷ cells/ml. For electroporation, the protocol was basically that described by Wakita et al. (2005): the cell suspension was mixed with viral RNA (either, obtained from Caco-2-infected cells or by *in vitro* transcription), transferred to 4 mm gap cuvettes and pulsed at 250 V and 950 μ F, using a BIORAD Gene Pulser II. Immediately after pulsing, cells were diluted to 6 ml with DMEM-FBS and distributed in multi-well plates to recover infectious particles, and for protein analysis and immunostaining. Five hours post-transfection and after cells attached, culture medium was removed, cells were washed with FBS-free MEM, and the same medium was added to incubate at 37 °C. Cells were harvested, or processed for immunostaining at the indicated times.

BHK-21 cells were transfected essentially as described for Huh7.5.1, but two different electroporation conditions were used: (I) 2 \times 10⁶ cells in 0.8 ml were mixed with the RNA; in this case, two pulses at 280 V and 250 μ F were given (Guix et al., 2005); and (II) 4 \times 10⁶ cells in 0.4 ml were mixed with the RNA, and two pulses at 1.5 KV and 25 μ F were given (Liljestrom et al., 1991). In both cases, cuvettes of 4 mm gap and BIORAD gene pulser II were used. After seeding, cells were processed as described for Huh7.5.1 cells. The transfection efficiency was calculated as percentage, by counting the number of infected against the non-infected cells detected by immunofluorescence with specific anti-HAsV antibodies and DAPI staining. Images were registered either using a microscope Nikon Diaphot 300, or Zeiss Axioscope 2 Mot Plus and the ImagePro-2 Plus software (Media Cybernetics).

2.6. Immunoassays

For immunofluorescence, cells were washed twice with PBS, fixed with 2% p-formaldehyde-PBS, and permeabilized with 0.1% Triton X-100. After blocking with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS with 50 mM ammonium chloride (PBS-NH₄), cells were incubated with the primary antibody (either anti-HAsV-8 or -HAsV-1) diluted 1:600 in PBS-NH₄ for 1 h at room temperature, and later with the secondary antibodies (goat anti-rabbit coupled with Alexa-488 (Molecular Probes, Cat. 11034) at the same dilution as the primary antibodies, and DAPI (Molecular Probes, Cat. D1306) 1:10,000. After every step, four cycles of washing with PBS-NH₄ were done.

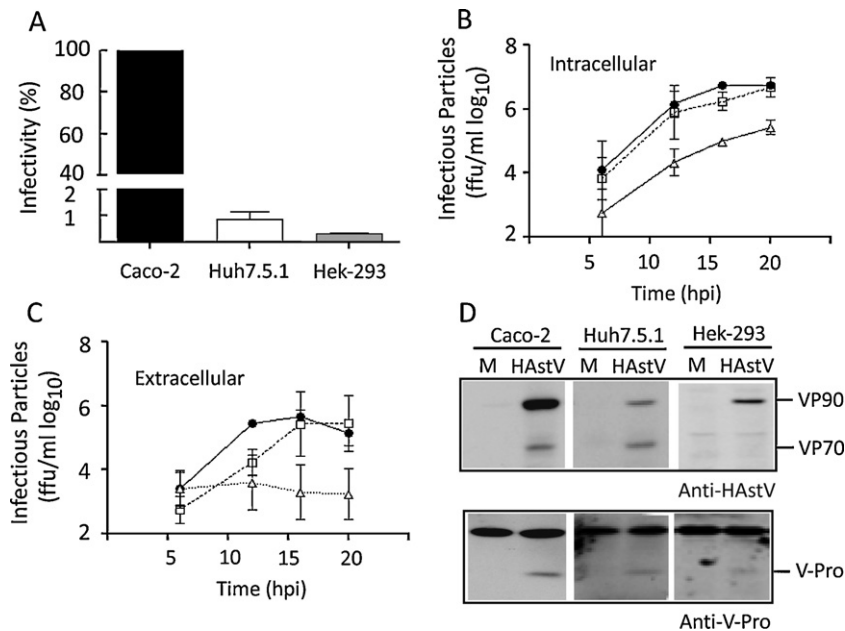


Fig. 1. HASTV infects cell lines with different efficiencies. The indicated cells were inoculated with HASTV-8 and the titer, viral proteins and virus yield associated with the intra- and extracellular fractions were analyzed. (A) The infectivity of HASTV-8 in every cell line tested was obtained by determining the virus titer in those cells, and expressed as percentage of that obtained in Caco-2 cells. Virus obtained at the indicated times in the intra- (B) and extracellular (C) fractions, respectively, were titrated on Caco-2 cells. (D) Cell lysate from Mock- (M) or HASTV-infected cells were harvested at 20 hpi, and the structural proteins (VP90 and VP70), and the viral protease (V-Pro) were immunodetected using anti-HASTV-8 and anti-V-Pro, respectively. One cellular protein that was detected with anti-V-Pro (*) was considered as loading control. Virus titer in Caco-2 (closed circles), in Huh7.5.1 (open squares) and Hek-293 (open triangles) are indicated in B and C.

For immunoblot, cells were harvested with 200 μ l of lysis buffer (0.5% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4) per well of 2 cm², at the indicated times. Equal volumes of these samples were analyzed by western blot by mixing with 2 \times Laemmli sample loading buffer (Tris pH 6.8 0.1 M; sodium dodecyl sulfate 4%; glycerol 20%; EDTA 4 mM; bromophenol blue), and boiled 5 min before electrophoresed in SDS-polyacrylamide gels (SDS-PAGE). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Millipore Cat. HATF00010) under standard conditions, which were later blocked with Tris-buffer saline (Tris-base 20 mM and NaCl 137 mM, pH=7.6) containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) plus 5% of non-fat dried milk by overnight (o/n) incubation at 4 $^{\circ}$ C. Primary and secondary antibodies were diluted in the same buffer and incubated with the membrane, either 1 h at room temperature, or overnight at 4 $^{\circ}$ C, each. Proteins were visualized by chemiluminescence using the Western Lighthing-Plus-ECL kit. (Perkin-Elmer, Cat. NEL105001EA).

2.7. Semi-quantitative analysis of viral RNA

The integrity of the viral RNA from HASTV-8-infected cells (Vc-RNA) after proteinase-K treatment was confirmed by RT-PCR (OneStep RT-PCR, Quiagen, Cat. 210212), at non-saturating conditions. Total cellular RNA (diluted 10⁻¹ to 10⁻³) were reversed transcribed, and amplified with oligonucleotides Mon344(+) (5'-TACAGACATGTGCATGAATGG-3') (nt 3677–3697), and Mon343(-) (5'-CAGGCTTTACCCACAT-3') (nt 3995–3980) (Belliot et al., 1997) for 15 cycles (30 s at 94 $^{\circ}$ C, 30 s at 55 $^{\circ}$ C, and 30 s at 72 $^{\circ}$ C). These conditions were confirmed to be non-saturating in order to have a semi-quantitative assay. The amplicons of 318 nt obtained were electrophoresed in 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide to visualize.

3. Results

3.1. Permissiveness of cell lines to HASTV

Few cell lines have been useful for successful HASTV propagation. Among these, human cells derived from colon adenocarcinoma, from embryo kidney, and from liver were identified as the most susceptible to most HASTV serotypes strains (Brinker et al., 2000). Although the colon adenocarcinoma cell line Caco-2 has been considered the best to isolate wild type HASTV from fecal samples (Willcocks et al., 1990), its low transfectability has restricted its use for genetic studies; therefore, the highly transfectable BHK-21 cells were used to establish a reverse genetic system for HASTV-1 (Geigenmuller et al., 1997), however, this cell line showed low efficiency to recover virus at one replication cycle. To improve this system, human cells derived from embryo kidney (Hek-293) that showed to be permissive for several HASTV serotypes (Brinker et al., 2000) and from liver tissue (Huh7.5.1) that showed defects in an interferon activation pathway (Zhong et al., 2005), both of which are highly transfectable, were tested for their susceptibility and permissiveness to HASTV. Thus, the ability of HASTV-8 to infect these cells, to process the viral polyproteins and to yield infectious particles, was evaluated in these cells and compared with that found in Caco-2 cells.

Huh7.5.1 and Hek-293 were infected with HASTV-8 poorly, since the virus titer in those cells was about 2 logs lower than in Caco-2 cells (Fig. 1A). Under these conditions, no infection was detected in BHK-21 cells (not shown), confirming its lack of susceptibility to HASTV infection. In Caco-2 and Huh7.5.1, the intracellular virus yield reached a plateau after 12–16 hpi (Fig. 1B), however, the virus yield in Hek-293 reached the highest titer at 20 hpi, but it was approximately 50 times lower than in Caco-2 and Huh7.5.1, which yielded almost the same virus titer of about 10⁷ ffu/ml. The extracellular virus yield was also very similar at 16–20 h in Huh7.5.1

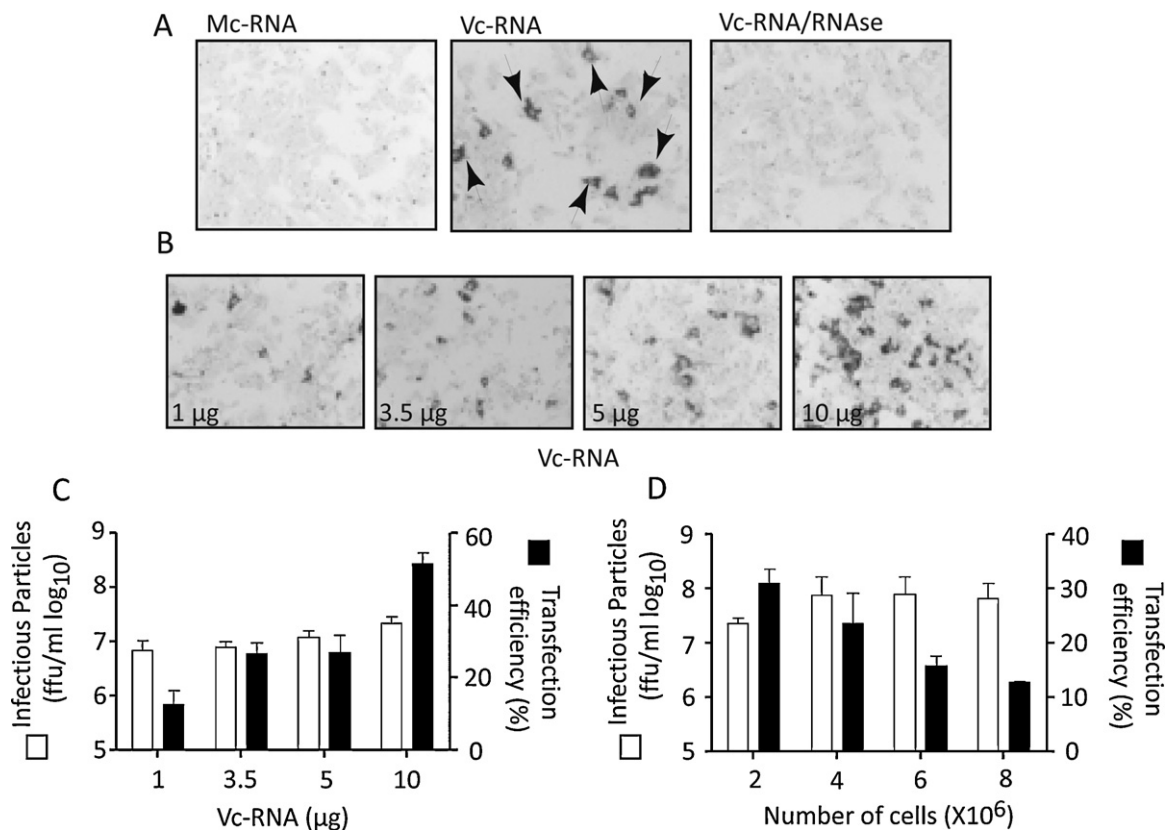


Fig. 2. Viral RNA extracted from HAstV-infected Caco-2 cells is infectious in Huh7.5.1. (A) Huh7.5.1 were electroporated with RNA from mock-infected (Mc-RNA), and RNA from HAstV-8-infected Caco-2 cells (Vc-RNA), either untreated, or treated previously with RNase, as indicated. After electroporation, cells were stained with anti-HAstV-8 to detect cells expressing the capsid protein (arrows). (B) The indicated amounts of Vc-RNA were electroporated and the capsid-expressing cells were immunodetected, based on which the transfection efficiency was quantified. Twenty hours after electroporation with the indicated amount of Vc-RNA (C), and number of cells (D), the transfection efficiency (black bars), and virus yield (white bars) were determined. Virus titers were determined in Caco-2 cells. Data in C and D were obtained from three different experiments made in duplicate.

and Caco-2, but not at earlier times (Fig. 1C); on the contrary, the viral titer did not increase in the extracellular fraction of Hek-293 infected cells (Fig. 1C), suggesting that astrovirus particles were not released from these last cells. The structural polyprotein (VP90) and the viral protease (V-Pro) were detected in all cell lines (Fig. 1D), suggesting that no drastic changes on the synthesis of these proteins, nor on the nonstructural protein processing were produced in these cells; however, the intracellular processing of VP90 to VP70, characterized previously in Caco-2 cells as associated with virus release (Banos-Lara and Mendez, 2010; Mendez et al., 2004), was not observed in Hek-293, but only in Huh7.5.1. The processing of VP90 to VP70 in Hek-293 was not observed even after caspases activity was induced by staurosporine (not shown). These findings suggested that HAstV-8 infection was more similar in Huh7.5.1 and Caco-2, than that in Hek-293, where infection of HAstV-8 was clearly different. Based on these findings, the hepatic Huh7.5.1 cells were later used for setting up the conditions for virus rescue after viral RNA transfection.

3.2. High yield of infectious virus is obtained in Huh7.5.1 after transfection

Given that the transfection protocol is an important step in any genetic system, the electroporation was selected as the method to be optimized, given its reproducibility (Ausubel et al., 1999), on Huh7.5.1 with total RNA extracted from HAstV-infected Caco-2 cells (Vc-RNA), expected to have a high specific infectivity (Geigenmuller et al., 1997). To first validate the infectivity of Vc-RNA, 4×10^6 Huh7.5.1 cells were electroporated with

3.5 µg of that RNA. RNA from mock-infected Caco-2 cells (Mc-RNA) and Vc-RNA treated previously with RNase-A were used as controls. As expected, cells expressing the capsid protein (marked with arrows in Fig. 2A) were observed when Vc-RNA was used for transfection, but not when RNase-treated Vc-RNA or Mc-RNA were used (Fig. 2A), indicating that the viral RNA introduced was able to replicate, and to generate sgRNA from which translation of the structural protein occurred; therefore, virus particles might be formed under these conditions. The number of capsid-expressing cells, considered as the criterion of transfection efficiency, increased with the Vc-RNA used (Fig. 2B). Quantification of these cells as well as of virus yield after 20 h post-transfection indicated that this efficiency increased 4 times, from about 13% to almost 50%, whereas the virus yield increased 3.2 times in the range of about 10^7 ffu/ml, when transfecting between 1.5 µg and 10 µg of Vc-RNA (Fig. 2C); although it remained very similar with 5 µg and 10 µg of Vc-RNA. Considering the number of viral antigen-positive cells, the putative moieties between 0.13 and 0.7 were reached under these conditions. On the other hand, the percentage of capsid-expressing cells diminished at the same ratio as the number of cells used for electroporation increased (Fig. 2D), indicating that the number of cells that were actually transfected at every cell concentration used was almost the same (approximately from 6×10^5 cells to 8×10^5 cells). In agreement with this finding, similar virus yield (about 7×10^7 ffu/ml) was obtained after electroporation of $4-8 \times 10^6$ cells (Fig. 2D). Based on these results, the electroporation conditions for the following experiments were with 5 µg of RNA and 4×10^6 cells.

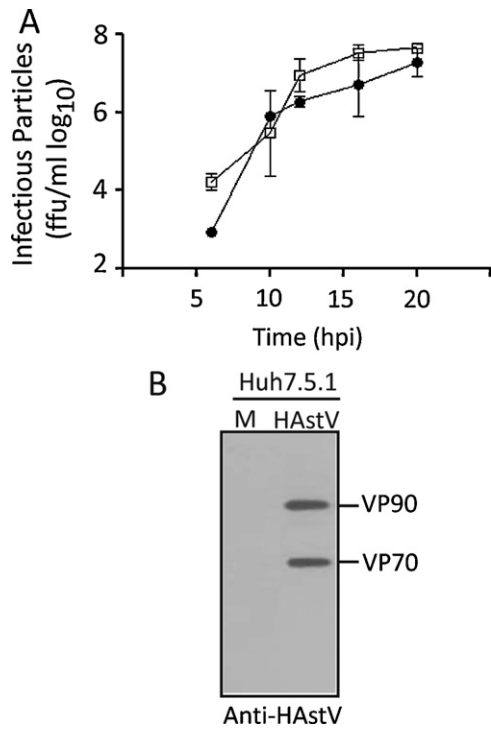


Fig. 3. HAdV growth in Huh7.5.1 cells is similar after transfection or infection. Huh7.5.1 were either electroporated with 5 μ g of Vc-RNA (closed circles) or infected with HAdV-8, at moi of 0.27 (open squares) to have the same number of capsid-expressing cells. At the indicated times (A), virus particles were harvested and titered on Caco-2 cell, as described in materials and methods. For the viral protein analysis (B), cell lysate from Huh7.5.1 transfected cells was harvested at 20 h and analyzed by western blot with anti-HAdV-8. M represents lysate from Huh7.5.1 cells transfected with Mc-RNA, and HAdV8, transfected with Vc-RNA. Data in A were obtained from three different experiments made in duplicate.

To determine the optimal time for virus harvesting after electroporation with Vc-RNA, and to confirm whether the infectious particles were produced at the same extent as that obtained after infection, a kinetic of virus production was carried out. Based on the number of transfected cells after electroporation obtained previously, the infection with HAdV-8 for this experiment was carried out at a moi of 0.27 to get the same number of capsid protein-positive cells. As observed in Fig. 3A, a very similar virus production kinetic was observed after Vc-RNA transfection and HAdV-8 infection, reaching virus titers in the range of about 10^7 ffu/ml at 16–20 h. The presence of VP90 and its processing product VP70 at 20 h post-electroporation (Fig. 3B), as it was observed after in Huh7.5.1 infection (Fig. 1D), confirmed that transfection of Huh7.5.1 with Vc-RNA was indistinguishable from HAdV-8 infection. Thus, Huh7.5.1 cells were shown to be suitable to obtain infectious particles at one replication cycle, at the same level as that obtained after the actual HAdV-8 infection; therefore, these cells were later evaluated to rescue virus from the pAVIC infectious HAdV-1 clone, described previously (Geigenmuller et al., 1997).

3.3. Huh7.5.1 are transfected efficiently with RNA from pAVIC to rescue infectious particles

To confirm whether Huh7.5.1 cells were suitable for HAdV-1 rescue, transfection of these cells in the same conditions (established for HAdV-8 Vc-RNA) was carried out, using *in vitro* transcribed RNA (ivRNA) from the pAVIC clone, and the efficiency for virus production and capsid protein synthesis was determined. In parallel, two protocols (I and II) used in different laboratories to transfect BHK-21 (Guix et al., 2005; Liljestrom et al., 1991)

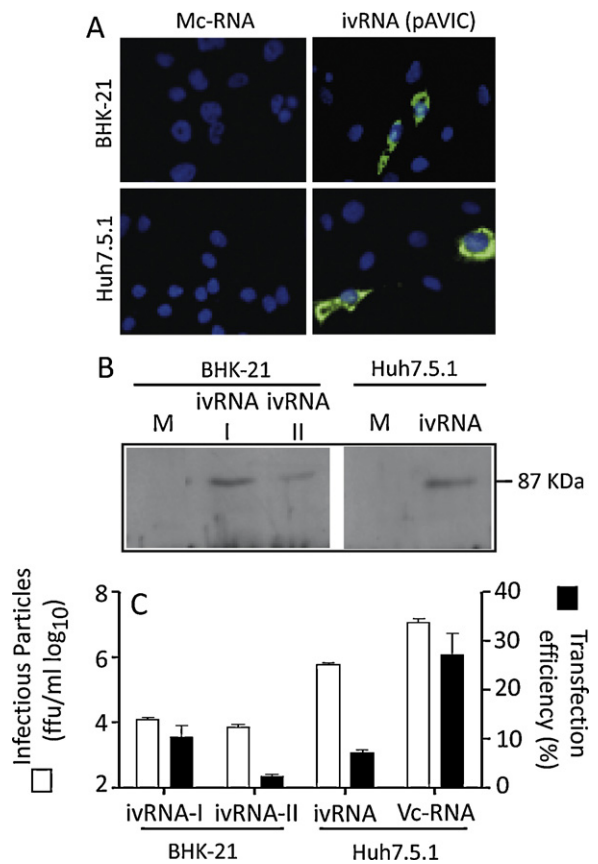


Fig. 4. Huh7.5.1 are more efficient than BHK-21 to rescue infectious virus from the pAVIC clone. Five micrograms of *in vitro* transcribed RNA (ivRNA) from the pAVIC clone, of Mc-RNA and of Vc-RNA (same nomenclature as in Fig. 2) were electroporated to the indicated cells, and these cells were analyzed after 20 h. (A) Cells were fixed and stained with anti-HAdV-1 and DAPI to detect HAdV-1 capsid-expressing cells. (B) The structural protein of HAdV-1 was detected with the same antibody, by immunoblot. (C) Transfection efficiency and virus yield were determined, with the indicated cells and RNA's. Legends are as in Fig. 2. Numbers I and II represent two protocols used for BHK-21 electroporation (see Section 2). Data in (C) were obtained from three different experiments made in duplicate.

described previously as packaging cells for HAdV-1 from the pAVIC clone (Geigenmuller et al., 1997), were also examined. The capsid protein of HAdV-1 was detected on transfected Huh7.5.1 and BHK-21 by immunofluorescence (Fig. 4A) and immunoblot (Fig. 4B). In the case of BHK-21, the protocol I was more efficient than protocol II, as more positive-cells (Fig. 4C) and more capsid protein (Fig. 4B) were observed. The intracellular processing product of the 87 kDa protein was not detected in BHK-21 nor in Huh7.5.1, probably due to the level of the capsid protein synthesized and not to the absence of caspases activity, at least in Huh7.5.1, since, as it was observed in Fig. 1, the caspases-dependent VP90 processing occurred after HAdV infection in these cells. Despite the transfection efficiency in BHK-21 using the protocol I and in Huh7.5.1 was similar (10.5% vs. 7.3%, respectively), and the level of the capsid protein was also similar in both cells, virus production from BHK-21 was about 10^4 ffu/ml, approximately 2 logs lower than that produced in Huh7.5.1 cells (Fig. 4C). These results reinforced the hypothesis that HAdV-1 particles seemed to be produced more efficiently in Huh7.5.1 than in BHK-21 cells at 20 h. Hence, Huh7.5.1 would be more useful to rescue particles from pAVIC clone than BHK-21, expecting that particles from the former cells would be genetically more homogeneous because virus was harvested at one replication cycle, in contrast to the time at which virus was harvested from BHK-21 in previous studies (Geigenmuller et al., 1997, 2002b; Guix et al., 2005). Of note, ivRNA yielded much less

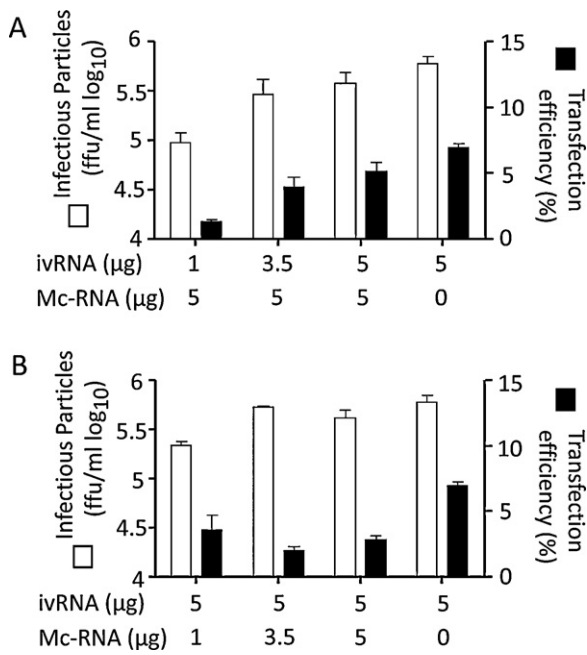


Fig. 5. Cellular RNA does not determine the efficiency of HAstV rescue from viral RNA. Huh7.5.1 cells were electroporated with a mixture of ivRNA and Mc-RNA, as indicated, and the transfection efficiency and virus yield were determined (as mentioned in Fig. 2). Data were obtained from three different experiments made in duplicate.

virus than Vc-RNA in Huh7.5.1 (approximately 20-fold difference, Fig. 4C), in spite that the viral RNA was more abundant in the *in vitro* transcribed preparation, indicating Vc-RNA had higher specific infectivity.

3.4. 5'-End modifications of HAstV RNA may contribute to its infectivity

Differences in the specific infectivity observed between viRNA and Vc-RNA could be due to modifications at the 5' end of the genome, given that a putative VPg has been suggested (Al-Mutairy et al., 2005), or due to the presence of mRNAs from the permissive Caco-2 cells, included in the Vc-RNA preparation, which might contribute to increase the RNA infectivity. To discard the role of the cellular RNA, Huh7.5.1 were electroporated with a mixture of ivRNA and Mc-RNA, varying either one of them, but maintaining the amount of the total transfected RNA at the same range as that used for the experiments shown in Fig. 2. As it is observed in Fig. 5A, the presence of 5 μg of Mc-RNA in the transfection mixture had no effect on the transfection efficiency nor on the virus production, which were only dependent on the amount of the ivRNA used for transfection, as shown previously for Vc-RNA (Fig. 2C). On the other hand, varying the amount of Mc-RNA did not seem to affect virus production, although its presence reduced the transfection efficiency (Fig. 5B). Thus, cellular RNA from Caco-2 cells apparently did not contribute for the high specific infectivity of the Vc-RNA preparation. On the other hand, the transfection efficiency and the yield of infectious virus were abolished after treatment of the Vc-RNA with proteinase-K (Fig. 6A); this treatment did not affect the integrity of the RNA, since the ribosomal RNA was unaffected (Fig. 6B), and the viral RNA was detectable at the same levels in a semi-quantitative RT-PCR assay (Fig. 6C), after the protease treatment. Together, these results suggested that the higher specific infectivity of the Vc-RNA could be due to the association of a protein with the viral genome (a VPg?), and not to the cellular RNA.

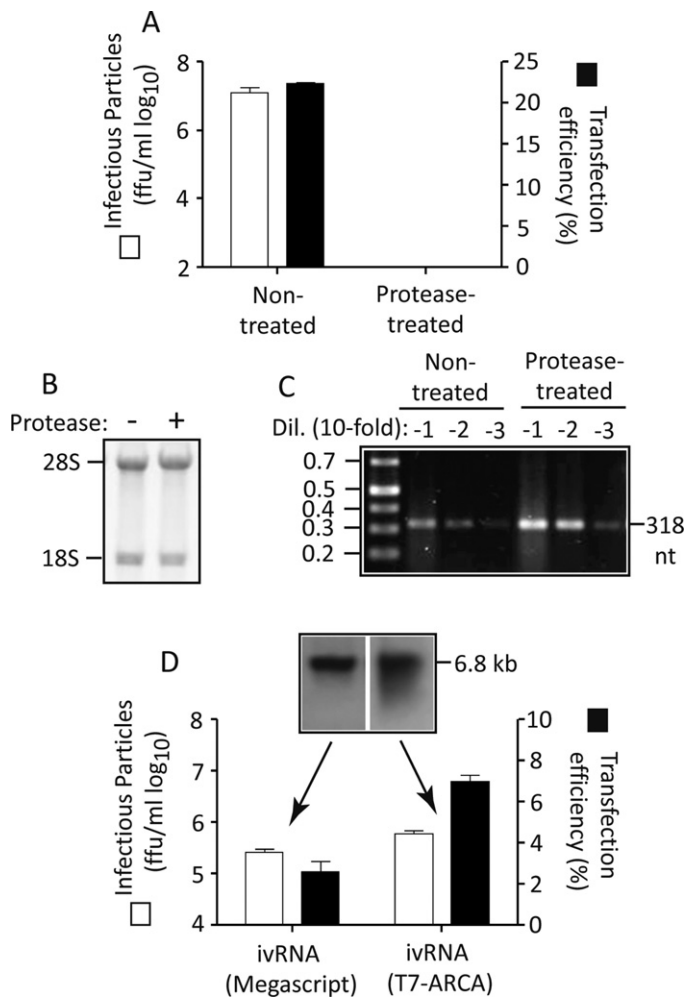


Fig. 6. The specific infectivity of viral RNA appears to depend on 5'-end modification. (A) Huh7.5.1 cells were electroporated with 5 μg of either untreated-Vc-RNA or treated previously with protease and the transfection efficiency and virus yield were determined (as in Fig. 2). To confirm that the protease did not affect the RNA integrity, ribosomal RNA (B) and the viral RNA detected by a semi-quantitative RT-PCR assay (dilutions of the RNA templates are indicated) (C) were observed in agarose gels, stained with ethidium bromide. (D) Huh7.5.1 was electroporated with 5 μg of ivRNA obtained from pAVIC clone, using two kits (Megascript, Ambion, and T7-ARCA, Epicentre, as indicated), which differ in the efficiency of correct Cap orientation at the 5'-end. The RNA produced is shown in the inset, and the transfection efficiency and virus yield were determined. Data in A and D were obtained from three different experiments made in duplicate.

To confirm that the 5'-end was important for the specific infectivity, the RNA that was going to be transfected into Huh7.5.1 cells was obtained by *in vitro* transcription using two methods, which differed in the efficiency at which the cap structure is added correctly at the 5'-end (Grudzien et al., 2004; Pasquinelli et al., 1995). These methods included transcription with the MegaScript kit (Ambion) in the presence of m7-G(5')ppp(5')G, and with the MessageMAX T7 kit (Epicentre) that includes Anti-reverse-cap-analogue (ARCA) in the reaction, the second method being the one that incorporates cap structure in the correct orientation at the 5'-end more efficiently (Grudzien et al., 2004; Pasquinelli et al., 1995). As expected, transfection with ivRNA obtained in the presence of ARCA yielded higher transfection efficiency and slightly better virus titer (Fig. 6D). These observations indicate that the specific infectivity of the viral RNA might be determined by the 5'-end modification(s).

4. Discussion

Although a reverse genetic system for HAsV was established several years ago (Geigenmuller et al., 1997), it has been exploited poorly, mainly because BHK-21, used as packaging cells, are poorly or non permissive (Brinker et al., 2000; Geigenmuller et al., 1997), necessitating several rounds of replication in both BHK-21 and permissive Caco-2 cells to obtain acceptable virus titers. This method has been partially useful to study variants of the structural (Geigenmuller et al., 2002b) as well as the nonstructural protein nsp1a (Guix et al., 2005); however, in this last case, additional mutations emerged after several passages, making difficult to discriminate the role of specific mutations on virus replication. In the search of additional cell lines that would be useful as packaging cells for the HAsV genetic system, to facilitate virus recovery at one replication cycle, Huh7.5.1 and Hek-293 were tested. Contrary to what was observed in Hek-293, infection of HAsV in Huh7.5.1 showed more similarity to that in Caco-2 cells. Similar features included the production of intra- and extracellular infectious virus particles at the same extent, and with the same kinetics, and the processing of the structural capsid protein VP90 to VP70. Based on the intracellular VP90 processing pathway, characterized previously in Caco-2 (Banos-Lara and Mendez, 2010; Mendez et al., 2004), it can be assumed that caspases activity was also induced in Huh7.5.1 after infection, but not in Hek-293. In these last cells, the absence of caspases activity due to infection was confirmed (Baños, R. Mendez, unpublished results). In these cells, no processing of VP90 occurred even when caspases were activated by exogenous agents, such as staurosporine (not shown), confirming that infection in Hek-293 was indeed clearly different. In agreement with this observation and on previous findings in Caco-2 (Banos-Lara and Mendez, 2010; Mendez et al., 2004), virus release from Hek-293 did not occur. Although still to be explored, the higher ratio of VP70/VP90 found consistently in Huh7.5.1 (Figs. 1D and 3B), compared with that observed in Caco-2, suggested that processing of the primary protein product was more prominent in these cells. Thus, Huh7.5.1 was selected to set up conditions for virus rescue from RNA.

The results of this study showed that Huh7.5.1 produced virus with the same efficiency after either Vc-RNA electroporation or HAsV infection, reaching similar yields. These cells were able to produce HAsV virions very efficiently, since, virus yield reached similar titers to those obtained in Caco-2, in spite of they were less susceptible to infection. The efficiency for virus production in Huh7.5.1 was confirmed after transfection with ivRNA from the pAVIC clone, since about 50 times more infectious virus was obtained from these cells than from BHK-21 (transfected with the protocol I), although the efficiency of transfection was almost similar in both cell lines, and the 87 kDa capsid protein was synthesized at similar levels in both cell lines.

The specific infectivity of viral RNA obtained from infected cells (Vc-RNA) and from *in vitro* transcription (ivRNA) was notably different. To try to find out the reason in order to improve the recovery of infectious particles from viral RNA, electroporation with a mixture of viral and cellular RNA from Caco-2 cells was carried out. The presence of cellular RNA in the transfection mixture did not affect the yield of infectious virus, although, it affected slightly the transfection efficiency. On the contrary, treatment of the Vc-RNA with proteinase-K abolished its infectivity, suggesting the presence of a protein linked to the genome, as it has been proposed (Al-Mutairy et al., 2005). Modifications at the 5'-end seem indeed important for viral RNA infectivity since ivRNA transcribed in the presence of ARCA, which incorporates the cap structure in the right orientation more efficiently, showed a higher specific infectivity. Thus, adding cap to the ivRNA more efficiently must improve the recovery of infectious virus with this system.

The efficiency of Huh7.5.1 cells to replicate and assemble HAsV observed after RNA transfection may be due to defects in the retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) pathway, which senses dsRNA to trigger an antiviral response (Rehwinkel and Reis e Sousa, 2010). The RIG-I gene carries a single mutation in Huh7.5 cells, parental of Huh7.5.1, which results in a reduced innate antiviral response (Sumpter et al., 2005). The high permissiveness of Huh7.5.1 cells to HCV has been indeed proposed to be due to these defects (Bartenschlager and Pietschmann, 2005; Sumpter et al., 2005). In the case of HAsV, defects in the RIG-I pathway might also provoke defects in the innate immune response mediated by interferon, triggered by the viral RNA transfected, or the viral RNA that replicated in the cell after transfection, which may contribute for a better replication and/or assembly of infectious particles. This observation suggested that this pathway might be necessary for limiting HAsV infection in normal cells; however, the evaluation of this hypothesis needs further studies.

In conclusion, an alternative method for virus rescue from the infectious clone of HAsV-1 was explored to improve virus yield at a single round of replication, being the main difference for the utilization of a permissive cell line (Huh7.5.1) to produce astrovirus.

Acknowledgements

We appreciate Drs. Suzanne Matsui and Ute Geigenmuller (Stanford University) for donating us the plasmid pAVIC used in this work. We thank A. Murillo for the valuable comments. This work was carried out in the Virology Laboratory at the Instituto de Biotecnología-UNAM, and it was supported partially by grants 79574 from CONACyT-México, and IN226106 and IN219910 from DGAPA-UNAM.

References

- Al-Mutairy, B., Walter, J.E., Pothan, A., Mitchell, D.K., 2005. Genome prediction of putative genome-linked viral protein (VPg) of astroviruses. *Virus Genes* 31, 21–30.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhla, J., 1999. *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 2. Wiley Interscience, New York.
- Banos-Lara, M.d.R., Mendez, 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.
- Bartenschlager, R., Pietschmann, T., 2005. Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a difference the host cell makes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102, 9739–9740.
- Bass, D.M., Upadhyayula, U., 1997. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. *J. Virol.* 71, 8666–8671.
- Belliot, G., Laveran, H., Monroe, S.S., 1997. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. *Arch. Virol.* 142, 1323–1334.
- Blomstrom, A.L., Widen, F., Hammer, A.S., Belak, S., Berg, M., 2010. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4392–4396.
- Brinker, J.P., Blacklow, N.R., Herrmann, J.E., 2000. Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines. *Arch. Virol.* 145, 1847–1856.
- Burnett, W.V., 1997. Northern blotting of RNA denatured in glyoxal without buffer recirculation. *Biotechniques* 22, 668–671.
- Finkbeiner, S.R., Holtz, L.R., Jiang, Y., Rajendran, P., Franz, C.J., Zhao, G., Kang, G., Wang, D., 2009. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Viol. J.* 6, 161–170.
- Geigenmuller, U., Chew, T., Ginzton, N., Matsui, S.M., 2002a. Processing of nonstructural protein 1a of human astrovirus. *J. Virol.* 76, 2003–2008.
- Geigenmuller, U., Ginzton, N.H., Matsui, S.M., 1997. Construction of a genome-length cDNA clone for human astrovirus serotype 1 and synthesis of infectious RNA transcripts. *J. Virol.* 71, 1713–1717.
- Geigenmuller, U., Ginzton, N.H., Matsui, S.M., 2002b. Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. *J. Gen. Virol.* 83, 1691–1695.
- Grudzien, E., Stepinski, J., Jankowska-Anyszka, M., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., Rhoads, R.E., 2004. Novel cap analogs for *in vitro* synthesis of mRNAs with high translational efficiency. *RNA* 10, 1479–1487.
- Guix, S., Caballero, S., Bosch, A., Pinto, R.M., 2005. Human astrovirus C-terminal nsp1a protein is involved in RNA replication. *Virology* 333, 124–131.

- Jiang, B., Monroe, S.S., Koonin, E.V., Stine, S.E., Glass, R.I., 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90, 10539–10543.
- Kapoor, A., Li, L., Victoria, J., Oderinde, B., Mason, C., Pandey, P., Zaidi, S.Z., Delwart, E., 2009. Multiple novel astrovirus species in human stool. *J. Gen. Virol.* 90, 2965–2972.
- Liljestrom, P., Lusa, S., Huylebroeck, D., Garoff, H., 1991. In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. *J. Virol.* 65, 4107–4113.
- Mendez, E., Arias, C.F., 2007. Astroviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 981–1000.
- Mendez, E., Fernandez-Luna, T., Lopez, S., Mendez-Toss, M., Arias, C.F., 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J. Virol.* 76, 7996–8002.
- Mendez, E., Salas-Ocampo, E., Arias, C.F., 2004. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J. Virol.* 78, 8601–8608.
- Mendez, E., Salas-Ocampo, M.P., Munguia, M.E., Arias, C.F., 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *J. Virol.* 77, 11378–11384.
- Mendez-Toss, M., Romero-Guido, P., Munguia, M.E., Mendez, E., Arias, C.F., 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *J. Gen. Virol.* 81, 2891–2897.
- Monroe, S.S., Jiang, B., Stine, S.E., Koopmans, M., Glass, R.I., 1993. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *J. Virol.* 67, 3611–3614.
- Pasquinelli, A.E., Dahlberg, J.E., Lund, E., 1995. Reverse 5' caps in RNAs made in vitro by phage RNA polymerases. *RNA* 1, 957–967.
- Quan, P.L., Wagner, T.A., Briesse, T., Torgerson, T.R., Hornig, M., Tashmukhamedova, A., Firth, C., Palacios, G., Baisre-De-Leon, A., Paddock, C.D., Hutchison, S.K., Egholm, M., Zaki, S.R., Goldman, J.E., Ochs, H.D., Lipkin, W.I., 2010. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 918–925.
- Rehwinkel, J., Reis e Sousa, C., 2010. Rigorous detection: exposing virus through RNA sensing. *Science* 327, 284–286.
- Sumpter Jr., R., Loo, Y.M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., Gale Jr., M., 2005. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J. Virol.* 79, 2689–2699.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., Liang, T.J., 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11, 791–796.
- Willcocks, M.M., Carter, M.J., 1993. Identification and sequence determination of the capsid protein gene of human astrovirus serotype 1. *FEMS Microbiol. Lett.* 114, 1–7.
- Willcocks, M.M., Carter, M.J., Laidler, F.R., Madeley, C.R., 1990. Growth and characterisation of human faecal astrovirus in a continuous cell line. *Arch. Virol.* 113, 73–81.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., Chisari, F.V., 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102, 9294–9299.