



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“EFECTO DE LA PROTEÍNA VIRAL NS1 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE IRF-3
EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INFLUENZA H1N1/A”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

NORA ANDREA LÓPEZ TERCERO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. BEATRÍZ GÓMEZ GARCÍA

ASESOR DE TESIS: DRA. ELIZABETH CASTILLO VILLANUEVA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. MÉX.

AGOSTO, 2016





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.



AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado académicamente desde mi bachillerato en la Escuela Nacional Preparatoria 4. A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por ser mi institución de formación durante la Licenciatura.

Al Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina dirigido por la Dra. Beatriz Gómez García por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis de licenciatura. A la Dra. Elizabeth Castillo Villanueva, por haberme apoyado en mi formación durante mi estancia en el laboratorio, y por haber dirigido mi proyecto de tesis así como LICyT I-II (Laboratorio de Investigación Científica y Tecnológica) y Servicio Social en este laboratorio.

A la Sociedad Mexicana de Bioquímica, a la Red Mexicana de Virología y al Comité organizador del IX Congreso Nacional de Virología (2015) por el apoyo económico otorgado para poder asistir y presentar el presente trabajo en dicho evento.

A la Fundación UNAM por la beca otorgada para titulación.

A mis revisores y sinodales, por sus sugerencias en mi proyecto de tesis de investigación:

Dra. Elizabeth Castillo Villanueva

Dr. Sergio Vaca Pacheco

Dra. Beatriz Gómez García

Dr. Felipe Vaca Paniagua

Dr. Rodolfo De La Torre Almaraz

Finalmente, con todo respecto quiero agradecer a mis profesores: Biól. Irene Quiróz Amenta, Dr. Cesar Flores Mateo, Dr. Ignacio Peñalosa por ser mis profesores que me transmitieron su pasión por la Biología, especialmente en la disciplina de Biología Molecular. Y a la Dra. Beatriz Gómez, Dr. Elizabeth Castillo y Dr. Rodolfo de la Torre, por compartir su pasión por los virus.



AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero agradecer a mis padres Lucía Tercero y Pedro López, por haberme apoyado toda mi vida y cuidado de mí. Estoy infinitamente agradecida con la vida por haberme dado a unos padres como ustedes, pese a todas las dificultades nunca desistieron. Los amo y admiro.

A mis hermanos Oscar, Nancy, y Luis, por todo su amor, cariño, alegría y comprensión a lo largo de mi vida, especialmente durante la universidad, juntos pudimos vencer muchos retos. Los amo.

A mis amigos biólogos: Alejandra Oseguera, Cinthya Escamilla, Liliana Reyes, Alberto Ugalde y Agustín Uriel Hernández, amigo donde quiera que te encuentres tienes un lugar muy especial en mi corazón. Gracias por todas las vivencias y momentos compartidos. Ustedes hicieron de mi estancia en la universidad algo muy divertido. Cada uno de ustedes aportó algo especial a mi persona, gracias por su amistad. Los amo.

A mi amiga QFB Laura Torres, por su apoyo, conocimiento y amistad durante mi estancia en el laboratorio. Al igual al Sr. Carlos por sus buenos deseos.

A la Dra. Beatriz Gómez por su paciencia y apoyo en mi formación. Es una gran científica que merece todo mi respeto, gracias doctora.

A mi profesor Carlos Rea Mendoza, mi primer mentor. De usted aprendí que se vale ser un soñador para poder cambiar y aportar algo bueno al mundo, creer y confiar en las personas, gracias por sus consejos y por creer en mí.

A la Dra. Elizabeth Castillo Villanueva, por haberme dado la oportunidad de ser tu alumna, por todos tus consejos, y por todo tu apoyo incondicional en esta etapa de mi vida sin ti no lo hubiera podido lograr, te admiro mucho. Gracias por haberme brindado tu amistad, te quiero mucho Eli. Tienes mi absoluto respeto y admiración, eres un gran ser humano y una gran científica.

**Esta tesis es con especial dedicación para: mis padres, hermanos y mi tutora
Elizabeth.**

“Si un hombre realmente lo desea puede cambiar sus estrellas” (*A Knight's Tale*).



ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	4
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMEN.....	8
I. INTRODUCCIÓN	9
I. 1. Generalidades del virus de Influenza	9
I. 1. 1. Clasificación.....	9
I. 1. 2. Estructura y composición de la partícula viral	9
I. 1. 1.3. Estructura del genoma viral.....	10
I. 1. 4. Ciclo de Replicación viral.....	13
a) Adsorción	13
b) Endocitosis y desencapsidación	13
c) Translocación de las vRNPs hacia el núcleo celular	13
d) Replicación y Transcripción	13
e) Ensamblaje	14
f) Liberación del virión.....	14
I. 1. 5. Variaciones antigénicas.....	15
I. 1. 6. Zoonosis viral.....	17
I. 1. 7. Tropismo celular	17
I. 1. 8. Patogénesis.....	18
I. 2. Cuadro clínico	19
I. 2. 1. Sintomatología	19
I. 2. 2. Transmisión.....	19
I. 2. 3. Grupos de riesgo	20
I. 3. Respuesta celular a la infección viral.....	20
I. 3. 1. Respuesta antiviral	20
I. 3. 2. Generalidades del Interferón	20
I. 3. 3. Activación del factor de transcripción IRF-3 durante la infección viral	21
I. 4. Participación de componentes virales en la infección.....	22



I. 4. 1. Generalidades de la proteína no estructural NS1 del virus de Influenza.....	22
I. 4. 2. Funciones de la NS1.....	23
I. 4. 3. Modificaciones post-traduccionales de la NS1	25
I. 5. Generalidades de los cuerpos de PML (PML-NBs) y la maquinaria de SUMOilación celular	26
I. 5. 1. Sistema de SUMOilación celular	26
I. 5. 2. Mecanismo de SUMOilación celular	27
I. 6. Diálogo molecular entre los componentes del virus de Influenza y el sistema de SUMOilación celular.....	28
II. ANTECEDENTES	30
III. HIPÓTESIS	32
IV. OBJETIVOS	33
IV. 1. Objetivo general	33
Evaluar el efecto de la NS1 sobre el estado de activación de la IRF-3.	33
IV. 2. Objetivos particulares.....	33
IV. 2. 1. Analizar la distribución intracelular de las proteínas celulares IRF-3, SUMO-1, y la proteína viral NS1 en células infectadas con Influenza H1N1 estacional y pandémica.	33
IV. 2. 2. Analizar la expresión de la proteína celular IRF-3 y la proteína viral NS1 durante la infección viral mediante ensayos de Western blot.	33
IV. 2. 3. Determinar el estado de activación de la IRF-3 (Fosforilación o SUMOilación) en células infectadas por Influenza H1N1 mediante ensayos de Inmunoprecipitación y Western blot.....	33
IV. 2. 4. Evaluar el efecto de la proteína viral NS1 sobre la activación de IRF-3 en células transfectadas con pcDNA-NS1 y pcDNA-SUMO-1 y en células transfectadas e infectadas con Influenza H1N1.	33
V. MATERIALES Y MÉTODOS	33
V. 1. Células y virus	33
V. 2. Ensayos de Inmunofluorescencia	34
V. 3. Extracción y cuantificación de proteínas totales.....	35
V. 4. Inmunodetección de proteínas (SDS-PAGE y Western blot).....	35
V. 5. Ensayos de Inmunoprecipitación	36
V. 6. Extracción y purificación del DNA plasmídico (pcDNA) de SUMO-1, NS1 y GFP.....	38
V. 7. Ensayo de Transfección en células A549	38
VI. RESULTADOS.....	39



VI. 1. Análisis de la distribución intracelular de las proteínas celulares IRF-3, SUMO-1, y la proteína viral NS1 en células infectadas con Influenza H1N1 estacional y pandémica.....	39
VI. 2. Expresión de la proteína celular IRF-3 y la proteína viral NS1 en la infección por Influenza H1N1 estacional y pandémica.	42
VI. 3. La Fosforilación y SUMOilación del factor de transcripción IRF-3.....	43
VI. 4. Efecto de la proteína viral NS1 sobre IRF-3	46
VII. DISCUSIÓN	47
VIII. CONCLUSIONES.....	51
IX. PERSPECTIVAS	52
X. REFERENCIAS	53
XI. ANEXO.....	58
A. 1. Grado de pureza del DNA de cada plásmido (pcDNA) SUMO-1, NS1 y GFP.	58
A. 2. Alineamiento múltiple de la NS1 de la cepa estacional y pandémica.	58
A. 3. Tabla que ilustra los posibles sitios de SUMOilación de la proteína NS1 de la cepa estacional y pandémica.....	58
A. 4. Secuencia de la proteína IRF-3 en donde se señalan los posibles sitios de SUMOilación.	¡Error! Marcador no definido.
A. 5. Tabla donde se ilustran los sitios de unión a SUMO en la proteína IRF-3 humana.....	59



ABREVIATURAS

A549	Células alveolares de adenocarcinoma humano epitelial tipo II
AP-1	Proteína Activadora-1
ATP	Adenosín-5-trifosfato
BSA	Albúmina de Suero Bovino
C	Cisteína
Cel	Célula
Cardif	Adaptador CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) e inductor de INF- β
CBP	Proteína de Unión a CREB
cDNA	DNA complementario
cRNA⁺	RNA complementario de polaridad positiva
CPSF30	Factor de Especificidad de Escisión y Poliadenilación 30
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de doble cadena
E	Ácido Glutámico
E1	Enzima de Activación de SUMO (SAE-1/SAE2)
E2	Enzima de conjugación a SUMO (Ubc 9)
E3	Enzima de ligación
ED	Dominio Efector de la proteína viral NS1
ESEV/EPEV	Ácido glutámico, Serina, Ácido glutámico, Valina/ Ácido glutámico, Prolina, Ácido glutámico, Valina
eIF4GI	Factor de Inicio de la Transcripción en Eucariontes 4G1
EMCV	Virus de la Encefalomiocarditis
EVOB	Virus de Ébola Zaire
Fig.	Figura
GAPDH	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa
GFP	Proteína Verde Fluorescente
G	Glicina
HA	Hemaglutinina
hpi	Horas post-infección
hpt	Horas post-transfección
HPAI	Cepa aviar H5N1 altamente patógena
hrs	Horas
IAV	Virus de Influenza A
IFN	Interferón
<i>Ifn-1</i>	Gen del interferón- α/β : <i>ifn-1</i>
IFN-I	Interferón tipo I (α/β)
IFN-II	Interferón tipo II (γ)
IFN-III	Interferón tipo III (λ)



IKKε	Cinasa relacionada a IKK
IP	Inmunoprecipitación
IP3K	Fosfatidil Inositol 3 Cinasa
IP-S	Estimulador-1 del promotor de Interferón
IRF-3	Factor 3 de regulación del Interferón
IRF3-P	Factor de regulación del interferón 3 fosforilado
ISGs	Genes Antivirales Estimulados por el Interferón
ISG15	Gen estimulado por el Interferón 15
K	Lisina
kDa	Kilo Dalton
KSHV	Virus del herpes humano 8/virus del sarcoma de Kaposi
M1/M2	Proteína de Matriz 1/2
MAVS	Proteína de Señalización Antiviral Mitocondrial
MAMs	Membranas asociadas a mitocondrias
MDA-5	Gen 5 de Diferenciación Asociado al Melanoma
MDCK	Células de riñón de perro con características de epitelio tubular y carcinoma papilar
MOI	Multiplicidad de Infección
mm	Milímetros
μg	Microgramos
μL	Microlitros
nm	Nanómetros
NA	Neuraminidasa
NES	Señal de Exportación Nuclear
NFκB	Factor Nuclear Kappa B
ng	Nanogramos
NIPCs	Células naturales productoras de Interferón-α
NK	Células <i>Natural Killer</i> : naturales asesinas
NLS	Señal de Localización Nuclear
NoLS	Señal de Localización Nucleolar
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína no estructural 1
ORF	Marco de lectura alternativo
2'-5'-OAS	2'-5'-Oligoadenilato Sintetasa
PA	Polimerasa Ácida
PABP (I/II)	Proteína de Unión a cola de Poli A (I/II)
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PB1/PB2	Polimerasa Básica 1/2
pcDNA	DNA plasmídico
pDCs	Células Dendríticas plasmocitoides
PFU	Unidades Formadoras de Placa



PKR	Proteína Cinasa R
PML-NBs	Cuerpos de PML
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrones
RBD	Dominio de unión a RNA de la NS1
RIG-I	Gen-1 inducible por ácido retinoico
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAds	RNA de doble cadena
RNA_m	RNA mensajero celular
RNA_{ss}	RNA de cadena sencilla y polaridad negativa
RNA_v	RNA genómico viral
rpm	Revoluciones por minuto
RSKV/RSEV	Arginina, Serina, Lisina, Valina/ Arginina, Serina, Ácido glutámico, Valina
S	Serina
svRNAs	Segmentos pequeños de RNA viral de polaridad negativa
SENPs	Proteasas específicas para SUMO
SeV	Virus Sendai
Sia	Ácido siálico
SUMO	De sus siglas en inglés <i>small ubiquitin-like modifier</i>
svRNAs	Segmentos pequeños de RNA viral de polaridad negativa
T	Treonina
TBK1	Cinasa de unión a TANK
TLRs	Receptores tipo Toll
UBL	Familia de proteínas similares a Ubiquitina
UTR	Región no traducida
VISA	Adaptador Viral de la Inducción de la señal VISA
vRNA_m	RNA mensajero viral
vRNP(s)	Ribonucleoproteína viral(es)
VSV	Virus de la Estomatitis Vesicular
WHO	Organización Mundial de la Salud
WT	Wilde Type: cepa silvestre



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema que ilustra la estructura del virus de Influenza..... 10

Figura 2. Estructura del genoma del virus de Influenza tipo A..... 12

Figura 3. Ciclo de replicación del virus de Influenza..... 15

Figura 4. Esquema de la estructura de la proteína no estructural 1 (NS1) del virus de Influenza..... 22

Figura 5. Sistema de SUMOilación celular..... 28

Figura 6. Esquema hipotético de la regulación de IRF-3 mediado por la NS1 durante la infección viral..... 32

Figura 7. Ensayo en placa en células MDCK..... 34

Figura 8. Distribución intracelular de las proteínas celulares IRF-3 y SUMO-1, en células infectadas con Influenza estacional y pandémica..... 40

Figura 9. Gráfica que ilustra la distribución de la proteína celular IRF-3 durante la infección con el virus de Influenza H1N1 estacional y pandémico..... 41

Figura 10. Distribución intracelular de la proteína viral NS1..... 41

Figura 11. Inmunodetección de la proteína celular IRF-3 (45-50 kDa) y de la proteína viral NS1 (25 kDa)..... 42

Figura 12. SUMOilación de la IRF-3 en la infección con el virus de Influenza estacional H1N1..... 45

Figura 13. Fosforilación y SUMOilación de la IRF-3 en la infección con el virus de Influenza H1N1 pandémico..... 46

Figura 14. La adición de SUMO-1 a la IRF-3 está influenciada por la proteína viral NS1. 47



RESUMEN

El virus de Influenza tipo A es un patógeno que infecta las vías respiratorias del hospedero. Es un virus zoonótico que presenta altas variaciones antigénicas y puede producir epidemias y pandemias. El genoma viral (RNA^{ss}) codifica para 11 proteínas virales. La proteína no estructural 1 (NS1), es una proteína multifuncional conocida como la principal antagonista del Interferón (IFN). Además se ha reportado que interacciona con el sistema de SUMOilación celular. La proteína celular IRF-3 es un factor transcripcional que modula la expresión del IFN. Se sabe que la NS1 de algunas cepas virales (H1N1) bloquea a la IRF-3, sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular empleado por la NS1 para modular la inhibición de la activación de IRF-3. En nuestro estudio, infectamos células A549 con el virus de Influenza estacional y pandémico, mediante ensayos de Inmunofluorescencia observamos que la distribución intracelular de la IRF-3 es diferente durante la infección con los virus estacionales (nuclear) *versus* los pandémicos (nuclear y citoplásmica), además colocalizó con la SUMO-1. Mediante ensayos de Inmunoprecipitación y Western blot, observamos que durante la infección con el virus estacional se inducía un incremento de la SUMOilación de la IRF-3. En contraste, en la infección con el virus pandémico los niveles de SUMOilación disminuyeron en la fase tardía de la infección, a un tiempo, en donde la activación de la IRF-3 (IRF3-P) se incrementó, estos resultados nos sugirieron que existe un dialogo molecular entre la SUMOilación y fosforilación de la IRF-3 en la infección con la cepa pandémica. Para evaluar el papel de la NS1 sobre la SUMOilación de la IRF-3 fuera del contexto de la infección, se realizaron ensayos de Transfección con un plásmido que expresa a la NS1 viral y se observó mediante ensayos de Inmunoprecipitación, un incremento en los niveles de IRF-3/SUMO-1, lo que sugiere que la NS1 favorece la SUMOilación de la IRF-3 en la infección viral.

PALABRAS CLAVE: **Influenza tipo A**, **NS1** (proteína viral no estructural 1), **IRF-3** (Factor de Regulación del Interferón 3), **modificaciones post-traduccionales**, **SUMO** (de sus siglas en inglés *Small Ubiquitin-Like Modifier*).



Efecto de la proteína viral NS1 sobre la activación de IRF-3 en la infección por el virus de Influenza H1N1/A

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. Generalidades del virus de Influenza

I. 1. 1. Clasificación

Los virus de Influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae. Esta familia se subdivide en seis géneros: *Thogotovirus*, *Isavirus*, *Quarantivirus*, *Influenzavirus A*, *B* y *C*. Además los virus de Influenza tipo A (IAV) se dividen en subtipos virales con base a los antígenos de superficie: Hemaglutinina y Neuraminidasa (Knipe & Howley, 2013).

De acuerdo con la clasificación de David Baltimore (1971) que se basa en las características del material genético (DNA o RNA), los virus de Influenza pertenecen al grupo V, ya que son virus con genomas segmentados de RNA de cadena sencilla de polaridad negativa ($^{-}$ ssRNA) (Knipe & Howley, 2013).

A diferencia de otros virus con genomas de RNA cuyo ciclo de replicación viral ocurre en el citoplasma de la célula hospedera, el ciclo de replicación de los orthomyxovirus ocurre en el núcleo de la célula infectada (Wagner *et al.*, 2008).

I. 1. 2. Estructura y composición de la partícula viral

Los virus de Influenza son pleomórficos, es decir, tienen una estructura variable. La estructura de la partícula viral puede ser esférica, cuyo diámetro va de 80-120 nm o filamentosa de alrededor de 300 nm de longitud, dependiendo del subtipo viral. Es un virus envuelto que posee una envoltura lipídica derivada de la membrana de la célula hospedera en donde se proyectan las glicoproteínas virales Neuraminidasa (NA) y Hemaglutinina (HA). En la membrana del virus también se encuentra la proteína viral M2 (*Matrix protein 2*) que funciona como canal iónico (Fig.1) (Knipe & Howley, 2013).

La cápside viral está formada por la proteína M1 (*Matrix protein 1*) que se localiza debajo de la membrana lipídica formando una estructura helicoidal. En la nucleocápside del virión se encuentran los ocho segmentos del genoma viral asociados a la RNA-polimerasa viral. Ésta a su vez está compuesta por tres subunidades: PB1 (*Polymerase basic 1*), PB2

(*Polymerase basic 2*) y PA (*Polymerase acid*). Los segmentos del genoma viral se encuentran cubiertos por múltiples unidades de la nucleoproteína viral (NP). Dentro del virión, cada segmento del genoma viral está asociado a la NP y a la RNA-polimerasa formando un complejo: ribonucleoproteína viral (vRNP) (Fig.1). La composición bioquímica de cada partícula viral es de aproximadamente: 1% RNA, 5-8% carbohidratos, 20% lípidos y 70% proteínas (Knipe & Howley, 2013).

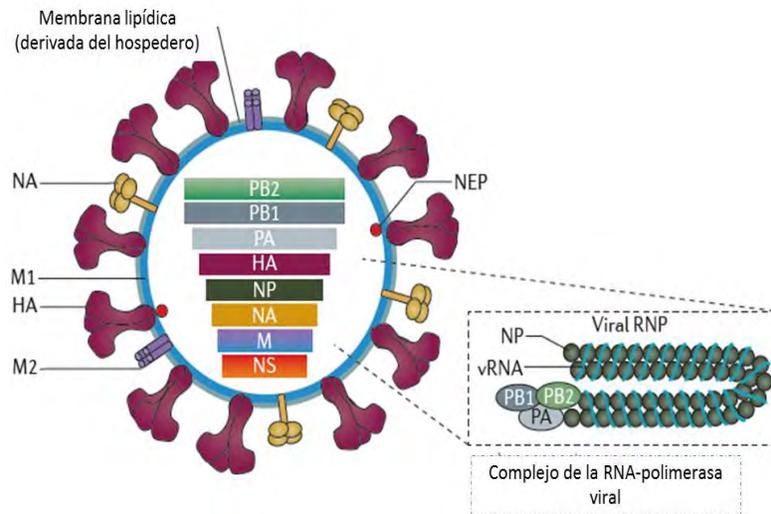


Figura 1. Esquema que ilustra la estructura del virus de Influenza. Tomada y modificada de Medina & García-Sastre (2011).

I. 1. 1.3. Estructura del genoma viral

El genoma de los virus de Influenza tipo A y B se compone de ocho segmentos de RNA de cadena sencilla y de polaridad negativa. En contraste, los genomas de los virus de Influenza tipo C se componen únicamente de siete segmentos. Algunos segmentos del genoma de Influenza tipo A y B codifican para más de una proteína viral. Los virus de influenza utilizan dos estrategias para aumentar la capacidad codificante de su genoma: 1) tienen marcos de lectura abiertos alternos (ORFs); y 2) diversos sitios para *Splicing* (Fig.2). Los segmentos 7 y 8 del genoma de Influenza A son procesados por la maquinaria de *splicing* celular y dan lugar a cuando menos dos proteínas diferentes, en total el genoma de Influenza tipo A codifica para 11 proteínas virales (Fig. 2) (Knipe & Howley, 2013).

El primer segmento del genoma de Influenza A codifica para la proteína viral PB2, compuesta por 759 aminoácidos (a.a.) (Fig.2). Es una de las tres subunidades de la RNA-polimerasa viral, y tiene un papel importante en el inicio de la transcripción, ya que se



encarga de unir el *cap* de los mensajeros celulares a las moléculas de pre-RNAm virales (Knipe & Howley, 2013).

El segundo segmento codifica para la PB1, está compuesta por 757 a.a. Es otro de los componentes de la RNA-polimerasa viral (Fig.2). Su función es adicionar nucleótidos durante la elongación de la cadena de RNA. Este segmento tiene un segundo marco de lectura abierto (+1) que codifica para la proteína PB1-F2, compuesta de 87 a.a., la cual tiene actividad pro-apoptótica y funciona como antagonista del IFN. Un tercer marco de lectura (0) da origen a la proteína N40 (PB1-N40), que se compone de 718 a.a., sin embargo, su función específica aún se desconoce (Fig.2) (Knipe & Howley, 2013).

El tercer segmento PA, codifica para el tercer componente de la RNA-polimerasa viral que consta de 716 a.a., y tiene actividad de endonucleasa y/o proteasa durante la transcripción viral (Fig.2) (Knipe & Howley, 2013).

El cuarto segmento codifica para la proteína HA, ésta es un trímero que se compone de 550 a.a. La HA se encuentra en la superficie de la partícula viral en forma de espícula y su principal función es unirse al receptor celular, el ácido siálico (Fig.2) (Knipe & Howley, 2013).

El quinto segmento codifica para la nucleoproteína viral NP, compuesta de 498 a.a.; se une al RNA viral y se encarga de la importación de las ribonucleoproteínas virales (vRNPs) hacia el núcleo celular (Fig.2) (Knipe & Howley, 2013).

El sexto segmento codifica para la proteína NA, es un tetrámero que se compone de 454 a.a. Al igual que la HA es un antígeno, y tiene actividad de neuraminidasa, es decir, rompe al ácido siálico, evitando así la formación de agregados de partículas virales y de esta manera se liberan los virus de la célula infectada (Fig.2) (Knipe & Howley, 2013).

El séptimo segmento del genoma, codifica para la proteína M1, que se compone de 498 a.a. Dentro de sus funciones se encuentran: 1) proteger a las ribonucleoproteínas virales (vRNPs) de agentes externos, 2) participa en la exportación de las vRNPs hacia el citoplasma de la célula, y 3) se encarga de reclutar a los componentes virales en la membrana del hospedero, sitio donde se da el ensamblaje del virión. Este segmento es



procesado por *splicing* y da origen a la proteína M2, que se conforma por 92 a.a., funciona como canal iónico, y también participa en el ensamblaje y formación de la envoltura viral (Fig.2) (Knipe & Howley, 2013).

El octavo segmento del genoma viral, da origen a dos proteínas virales: la primera es la proteína no estructural NS1, que se compone de alrededor de 230 a.a. La NS1 es la proteína viral encargada de inhibir la respuesta antiviral de la célula infectada por diferentes mecanismos que se describen más adelante, es conocida como la principal antagonista del Interferon (IFN). La segunda es la proteína de exportación nuclear NS2/NEP, constituida por 121 aminoácidos. Esta modula la exportación de las vRNPs del núcleo al citoplasma de la célula (Knipe & Howley, 2013).

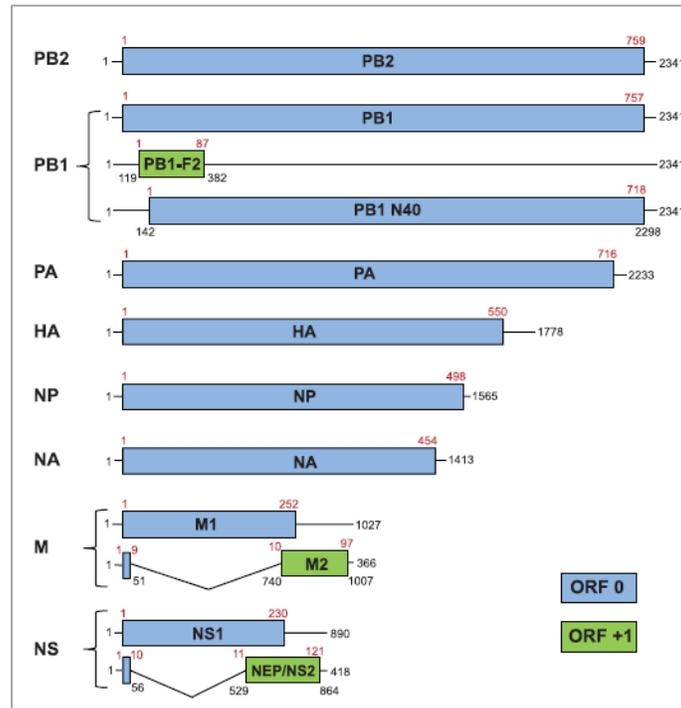


Figura 2. Estructura del genoma del virus de Influenza tipo A. Cada segmento del genoma se muestra en un sentido positivo (5'-3'). El número de nucleótidos se muestra en negro y en rojo el número de aminoácidos que compone a cada una de las proteínas virales. En los extremos terminales de cada segmento se ilustran las regiones no codificantes (UTR) en forma de líneas. El genoma viral completo del virus de Influenza tipo A está formado por ocho segmentos que puede codificar para 10-11 proteínas virales. Esto se debe a que un mismo segmento puede codificar para más de proteína por dos vías: Marco de lectura alternativo (ORF) o *splicing* alternativo, en el esquema se ilustran como cuadros verdes, los intrones se ilustran como líneas en forma de V. Tomado y modificado de Knipe & Howley (2013).



I. 1. 4. Ciclo de Replicación viral

El ciclo de replicación del virus de Influenza se lleva a cabo en el núcleo de la célula infectada (Killip *et al.*, 2014). Éste a su vez se divide en varias etapas que se describen a continuación (Fig.3):

a) Adsorción

La infección viral inicia por el reconocimiento del dominio de unión al receptor (RBD) de la HA con el receptor celular de ácido siálico (Sia), en la conformación α -2/6 en humanos o α 2/3 en aves, este receptor se encuentra en mayor proporción en la superficie de las células epiteliales del aparato respiratorio (Knipe & Howley, 2013).

b) Endocitosis y desencapsidación

Una vez que la HA se unió al ácido siálico la partícula viral es internalizada por endocitosis, mediada por clatrina. Posteriormente el endosoma se acidifica por la actividad del canal M2. La acidificación del endosoma produce un cambio conformacional de la HA que favorece la fusión de la membrana viral con la membrana del endosoma y de esta manera las vRNPs son liberadas en el citoplasma de la célula infectada (Knipe & Howley, 2013).

c) Translocación de las vRNPs hacia el núcleo celular

Los componentes de la polimerasa (PB1, PB2 y PA) y la proteína NP, contienen señales de localización nuclear (NLS), las cuales son reconocidas por la maquinaria de importación celular para el transporte de las vRNPs hacia el núcleo celular. La señal NLS de la NP viral interacciona con las importinas α/β de la célula, permitiendo así, el transporte de las vRNPs a través del complejo del poro nuclear hacia el interior del núcleo. Este proceso ocurre aproximadamente 30 minutos después de la adsorción (Knipe & Howley, 2013).

d) Replicación y Transcripción

Una vez que las vRNPs se encuentran en el núcleo celular, la RNA-polimerasa viral (que es dependiente de RNA) lleva a cabo la Replicación y Transcripción del genoma viral generándose tres tipos de RNA:

- 1) La RNA-polimerasa viral genera RNA mensajero (vRNAm), usando a las vRNPs (3'-5') como templado, los mensajeros virales son poliadenilados. La RNA



polimerasa viral corta la *Cap* del extremo 5' del pre-RNAm celular y lo añade al RNAm viral, favoreciendo la exportación de los mensajeros virales sobre los celulares.

- 2) La replicación del genoma ocurre a través de un RNA complementario de polaridad positiva (cRNA⁺) (5'-3'), el cual es reconocido por la RNA-polimerasa viral y utilizado como templado para generar los nuevos genomas virales.
- 3) Segmentos pequeños de RNA viral de polaridad negativa (svRNAs), regulan a la RNA-polimerasa viral para que transcriba o replique el genoma viral (Wagner *et al.*, 2008) (Medina & García-Sastre, 2011) (Knipe & Howley, 2013) (Killip *et al.*, 2014).

e) Ensamblaje

Las proteínas virales que participan en la transcripción son translocadas al núcleo de la célula, y los complejos de ribonucleoproteínas sintetizados *de novo* son exportados al citoplasma para iniciar el ensamblaje de las partículas virales, asistidas por las proteínas M1 y NEP. Las proteínas HA, NA y M2 son traducidas en el retículo endoplásmico, en donde se lleva a cabo su plegamiento y son modificadas post-traduccionalmente por glicosilaciones, excepto la M2. Posteriormente, son transportadas por la vía secretora trans-Golgi, y son exportadas hacia las balsas lipídicas de la membrana plasmática, lugar en donde se termina de ensamblar las partículas virales, asistidas por las proteínas virales M1 (Medina & García-Sastre, 2011) (Knipe & Howley, 2013).

f) Liberación del virión

En este último paso, la actividad enzimática de la NA es fundamental, ya que corta los residuos de ácido siálico de la membrana de la célula para favorecer la liberación de los nuevos viriones, partículas virales infecciosas (Knipe & Howley, 2013).

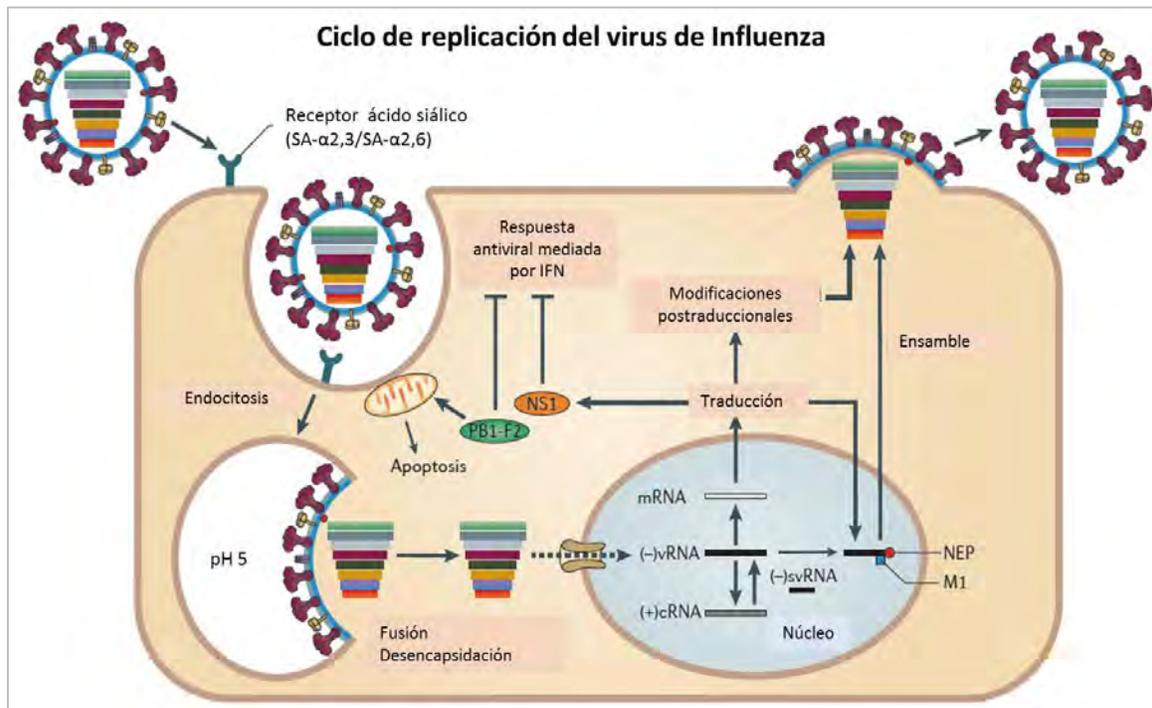


Figura 3. Ciclo de replicación del virus de Influenza. Se muestran los diferentes estadios de la infección viral dentro de la célula hospedera para generar nuevas partículas virales infecciosas. Tomada de Medina y García-Sastre (2008).

I. 1. 5. Variaciones antigénicas

La Deriva antigénica (*Antigenic Drift*), son el resultado de mutaciones puntuales espontáneas que ocurren en los genes que codifican para la HA y NA de un subtipo del virus de la Influenza que se traducen en cambios antigénicos y biológicos en dichas proteínas. Este tipo de mutaciones ocurre en una frecuencia menor al 1% anualmente (Knipe & Howley, 2013).

El salto antigénico (*Antigenic Shift*), son variaciones mayores en el genoma. Surgen a partir de una recombinación o re-arreglos entre los segmentos del genoma viral de virus que infectan a aves y a mamíferos (como humanos y cerdos). Este tipo de re-arreglos genéticos ocurren cuando dos o más subtipos del virus de Influenza A infectan a una misma célula (co-infección), y cuando se replica su genoma en el núcleo de la célula infectada, puede ocurrir una mezcla entre los diferentes segmentos del genoma, incluyendo los segmentos HA y NA. Como resultado se genera una nueva variante del virus de Influenza que no ha estado previamente entre la población humana o bien ocurre el re-surgimiento de cepas que



no habían circulado entre humanos en un cierto lapso de tiempo, en consecuencia la inmunidad es baja o inexistente (Flint *et al.*, 2009) (Knipe & Howley, 2013).

A partir de este tipo de re-arreglos han surgido virus pandémicos que han afectado a la humanidad a lo largo de la historia. La primera pandemia reportada fue causada por el subtipo H1N1 en el año 1918, conocida como “Influenza española” que causo alrededor de 50 millones de muertes, siendo la población de adultos jóvenes la más afectada (Knipe & Howley, 2013). Se ha sugerido que el surgimiento de este subtipo ocurrió por una infección por influenza aviar que contenía los segmentos HA, NA y PB1 de influenza humano (Watanabe *et al.*, 2012). El segundo reporte de pandemia ocurrió en el año 1957, conocida como “Influenza asiática”, fue causada por el subtipo H2N2 (2-4 millones de muertes). Posteriormente, en el año 1968 un nuevo brote fue causado por el subtipo H3N2 en Hong Kong (1-2 millones de muertes). Durante este tiempo, los epidemiólogos demostraron que éste tipo de re-arreglos genéticos ocurren en áreas donde la población humana está en contacto directo con aves de corral y cerdos, en donde la interacción entre especies es altamente probable (Flint *et al.*, 2009). Hacia el año 1977 en Rusia, reemergió el subtipo H1N1/A. Recientemente, en el año 2009 ocurrió una nueva pandemia causada por una variante de éste subtipo, denominada “Influenza porcina”, siendo México y Estados Unidos (California) el centro de origen, sin embargo, el virus se propagó rápidamente alrededor del mundo, y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se reportaron más de 18 000 muertos (Knipe & Howley, 2013) (WHO, 2010). En esta última pandemia se observó un triple re-arreglo entre segmentos del virus de Influenza porcina clásica (subtipo H1N1 de 1918) (HA, NP, NS1/2, NA y M1/2) e Influenza aviar (PB2 y PA) de Norte América y virus estacionales humanos del subtipo H3N2 (PB1). Además, se reportó que las características clínicas y patológicas eran similares a la pandemia de 1918, lo que sugiere que probablemente el origen, aún no dilucidado, de esta pandemia en humanos era una adaptación para cerdos (Michaelis *et al.*, 2009).

Por lo cual, se han considerado tres criterios para que un subtipo de Influenza A se pueda transmitir de humano a humano y tenga la capacidad de producir pandemia: A) un subtipo de HA emergente o re-emergente que no haya infectado a humanos en al menos una



generación. B) que sea altamente infeccioso en humanos. C) contagio eficiente y sostenido (continuo) en humanos (Watanabe et al., 2012).

I. 1. 6. Zoonosis viral

Como se mencionó, los virus de Influenza tipo A se caracterizan por presentar variaciones antigénicas en las glicoproteínas de superficie, este hecho permite al virus cruzar la barrera entre especies e infectar, además del humano, a otros animales como: aves silvestres y de corral, cerdos, caballos, visones, focas, ballenas, perros y gatos (Knipe & Howley, 2013). Sin embargo, existe una cierta especificidad entre los subtipos que infectan a cada especie, por ejemplo, los únicos subtipos de Influenza A, estacionales, que circulan en la población humana son: H1N1, H2N2 y H3N2; en contraste, el subtipo H5N1, que infecta principalmente a aves, aunque son altamente patógenos en humanos, aún no adquieren la habilidad de transmisión de humano a humano (Kuo *et al.*, 2010). Por otra parte, los virus de Influenza porcina generalmente no infectan a humanos, cuando ocurren infecciones se denominan como una variante (v). Los diferentes subtipos porcinos que se han detectado en humano son: H1N1v, H3N2v y H1N1v (CDC, 2014).

I. 1. 7. Tropismo celular

Por otra parte, aunque el virus de Influenza A tiene la capacidad de infectar a diferentes especies, existen patrones moleculares que determinan el rango de restricción del hospedero, a esta condición se le denomina tropismo celular. El receptor celular que requiere el virus de Influenza es el ácido siálico. Esta molécula está cargada negativamente y en posiciones terminales es común encontrarla en glicoproteínas o glicolípidos. Dentro del grupo ácido siálico, el ácido N-acetil neurámico (NeuAc) es un miembro común y es sintetizado por humanos, sin embargo, otras variantes no lo son como: el ácido N-glicolil neurámico (NeuGc), que también es reconocido por el virus de Influenza (Knipe & Howley, 2013).

En humanos, el ácido siálico se encuentra unido a galactosa (N-acetil galactosamina) y es predominante en tejidos del sistema respiratorio en una conformación α -2,6 (NeuAc α -2,6 Gal) principalmente en: células de la mucosa nasal, senos paranasales, faringe, tráquea y bronquios. Por otra parte, también se puede encontrar ácido siálico en la conformación α -2,3 (NeuAc α -2,3 Gal) en células cuboidales no ciliadas de bronquiolo. Sin embargo, el



receptor predominante en epitelio respiratorio de aves es el ácido siálico en esta conformación. El hecho de que ambos receptores estén en humanos explica porqué ciertos subtipos como el H5N1 (Influenza aviar) también infecta a humanos (Knipe & Howley, 2013). Por otro lado en células epiteliales del aparato respiratorio superior del cerdo (nariz, tráquea, bronquios y alveolos) también se encuentra ácido siálico en una conformación α -2/6 y en menor proporción α -2/3 (excepto en nariz y tráquea). En consecuencia, puede ser infectado por un virus de Influenza que infectan aves y humanos, por lo tanto se considera al cerdo como el hospedero intermediario (*mixing vessel*). Como se mencionó anteriormente, algunos virus que infectan al cerdo tienen potencial de producir pandemias. Sin embargo, debido a la proporción y distribución de los receptores de ácido siálico en el cerdo que es similar al del humano, recientemente se ha considerado al humano como una posible fuente de transmisión de los virus de Influenza estacionales en cerdos (Trebbien *et al.*, 2011) (Nelson & Vincent, 2013).

Por otra parte, se ha reportado que hay una alta especificidad de la proteína viral HA por el receptor celular, tanto de Influenza humana como aviar, por lo cual es determinante para la restricción del rango del hospedero. De esta forma, la HA de los virus que infectan a humanos como el subtipo H1N1, reconoce el receptor de ácido siálico en una conformación α -2,6 (Sia α -2,6Gal). En contraste, la HA del subtipo H5N1 que infecta a aves, se une al receptor en una conformación α -2,3 (Sia α -2,3Gal) (Knipe & Howley, 2013).

Por otra parte, la NA también muestra un patrón de reconocimiento a ciertos tipos de ácido siálico. Y por lo tanto la actividad enzimática de esta proteína también restringe el rango del hospedero, es decir, la NA del virus de Influenza aviar corta en receptores de ácido siálico en una conformación α -2,3 y la NA de Influenza humana en una conformación α -2,6 (Knipe & Howley, 2013).

I. 1. 8. Patogénesis

Se ha reportado que la secuencia de aminoácidos de los componentes de la RNA-polimerasa viral (PB1, PB2 y PA), influyen en la patogenicidad del virus. Aunado a esto, la proteína viral NS1 es un componente clave durante la replicación viral puesto que esta proteína interfiere con la respuesta antiviral del hospedero (Knipe & Howley, 2013).



El virus de Influenza se caracteriza por infectar células epiteliales del aparato respiratorio, aunque también puede infectar a células dendríticas y macrófagos, esto conlleva a la activación de la respuesta inmune; aunque el virus se puede replicar en todo el aparato respiratorio ciertos sitios son óptimos para la generación eficiente de progenie viral infecciosa, que en parte son determinados por la distribución de los receptores de ácido siálico. Y, por otro lado se conoce que la tasa de replicación viral es mayor a partir de las 48 horas post-infección (hpi) (Knipe & Howley, 2013).

Durante la infección viral se inducen cambios en todo el aparato respiratorio, sin embargo, estos suelen ser más prominentes en el aparato respiratorio inferior, e incluye una serie de sintomatologías como: inflamación en laringe, tráquea, bronquios y mucosa nasal; edema; neumonía; trombosis y necrosis, ya que a nivel celular el virus bloquea la síntesis de proteínas e induce la apoptosis. Es importante mencionar que hacia el tercer o quinto día de la infección, se observa una regeneración del tejido, por lo que si llegase a ocurrir daño epitelial se observa después de un mes de la infección (Knipe & Howley, 2013).

I. 2. Cuadro clínico

I. 2. 1. Sintomatología

El cuadro clínico en la infección por el virus de Influenza se caracteriza por presentar: secreción nasal, fiebre, tos (generalmente seca), escalofríos, dolor muscular y articular, dolor de cabeza y garganta. Aunque el periodo de incubación ocurre en un rango de 1 a 5 días, en donde a las 48 hpi se presenta fiebre de hasta 40°C, los síntomas suelen desaparecer en un lapso de una semana. Sin embargo, puede ocurrir una infección secundaria por bacterias como: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, entre otras (Knipe & Howley, 2013) (WHO, 2014).

I. 2. 2. Transmisión

El virus de Influenza puede propagarse a través de las gotículas que expulsa la persona infectada al toser o estornudar y pueden ser aspiradas por personas no infectadas. El virus puede permanecer en superficies o manos infectadas, por lo que también es un medio de contagio (Knipe & Howley, 2013) (WHO, 2014).



I. 2. 3. Grupos de riesgo

Las epidemias anuales suelen afectar a toda la población pero ciertos grupos pueden sufrir complicaciones: menores de 2 años, mujeres embarazadas, adultos mayores y pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades crónicas. Sin embargo, en la última pandemia (2009) la población joven fue la más afectada (Knipe & Howley, 2013) (WHO, 2014).

I. 3. Respuesta celular a la infección viral

I. 3. 1. Respuesta antiviral

El tracto respiratorio, sitio en donde ocurre el ciclo de replicación viral, tiene mecanismos no específicos que pueden prevenir la entrada del virión en la célula como: una capa de mucina, movimiento mecánico de cilios e inhibidores de proteasas. Sin embargo, en un periodo corto de la infección, la inmunidad innata es esencial para contender con la infección viral (Knipe & Howley, 2013). Por lo que, una vez que los componentes virales se detectan dentro de la célula infectada, se produce una cascada de citocinas que conllevan a la activación y síntesis del IFN-I (α/β), que al activarse establece un estado antiviral en la célula infectada (Killip *et al.*, 2014).

I. 3. 2. Generalidades del Interferón

Los Interferones (IFNs) son una familia de pequeñas proteínas tipo citocinas que se producen en un tiempo temprano de la infección viral e inducen la respuesta inmune innata (Killip *et al.*, 2015). De acuerdo con la secuencia de aminoácidos así como el tipo de receptor, los IFNs se clasifican en tres tipos: i) IFN-I, que incluyen a los múltiples subtipos de Interferón- α y un solo tipo β . Todas las células en respuesta a la infección viral son capaces de producir IFN-I, sin embargo se secreta principalmente por células dendríticas plasmocitoides (pDCs) anteriormente conocidas células naturales productoras de Interferón- α (NIPCs) (Theofilopoulos *et al.*, 2005). ii) IFN-II o Interferón- γ solo se conoce un subtipo, secretado por linfocitos T activos y células NK (*Natural Killer*) en la infección con microorganismos intracelulares. iii) IFN-III que incluye a los tres diferentes tipos de IFN- λ también denominados como Interleucinas (IL: 29, 28A, 28B respectivamente) y el IFN λ 4 recientemente descubierto. Se ha descrito que el IFN-III es secretado en respuesta a la infección con virus respiratorios incluyendo Influenza (Egli *et al.*, 2014). En la infección con este virus es secretado principalmente por células epiteliales de las vías respiratorias, al igual que el IFN-I por células pDCs y macrófagos (Killip *et al.*, 2015).



I. 3. 3. Activación del factor de transcripción IRF-3 durante la infección viral

El factor de transcripción IRF-3 es una proteína compuesta de 452 a.a. La IRF-3 se expresa de manera constitutiva en diversos tipos celulares por lo que existe una cantidad basal de esta proteína en las células, incluso sin estar infectadas, en esta condición la proteína IRF-3 se encuentra preferentemente en citoplasma. Se ha descrito que tiene secuencias de localización y de exportación nuclear, *NLS* y *NES*, respectivamente. La señal *NLS* permite el desplazamiento de la IRF-3 de citoplasma al núcleo una vez que la proteína es activada vía fosforilación, sin embargo, en condiciones normales y debido a la señal *NES*, la IRF-3 se encuentra preferencialmente en el citoplasma de la célula (Ysebrant de Lendonck *et al.*, 2014).

El sistema inmune innato es la primera barrera de defensa contra infecciones, causadas por virus o bacterias, a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, por sus siglas en inglés PAMPs, que incluyen al DNA y/o RNA viral. Estas moléculas son detectadas por los receptores de reconocimiento de patrones (PPRs), genes antivirales como: RIG-I y Toll-like receptors (RLRs y TLRs) (Honda & Taniguchi, 2006) (Ysebrant de Lendonck *et al.*, 2014).

El gen RIG-I (*Retinoic Acid-Inducible Gene 1*) y MDA-5 (*Melanoma Differentiation-Associated Gene 5*), se encuentran en el citoplasma y son los encargados de detectar al RNA viral. Una vez reconocido, se activa el motivo MAVS/Cardif/VISA (también conocido como adaptador IP-S). La proteína MAVS se encuentra en la mitocondria, peroxisomas y membranas asociadas a mitocondrias (MAMs). Una vez que se activa la MAVS ocurre una subsecuente activación de cinasas: IKK ϵ y TBK1, éstas son las encargadas de fosforilar río abajo a la IRF-3 e IRF-7 en residuos de Treonina (T) y Serina (S) del extremo carboxilo. La fosforilación de IRF-3, provoca la formación de dímeros (IRF3-P), en esta conformación ocurre la translocación de citoplasma hacia el núcleo celular. En este sitio, la IRF-3 se asocia con otros factores de transcripción (NF κ B/ AP-1) y modificadores de la cromatina: la proteína de unión a CREB (CBP) y p300, que promueven la transcripción de sus genes blanco como: el gen IGS e IFN (Honda & Taniguchi, 2006) (Ysebrant de Lendonck *et al.*, 2014).

I. 4. Participación de componentes virales en la infección

I. 4. 1. Generalidades de la proteína no estructural NS1 del virus de Influenza

El octavo segmento del genoma viral codifica para la proteína no estructural 1 (NS1), que mide de 230 a 237 a.a., dependiendo del subtipo viral. La proteína NS1 está compuesta por dos dominios funcionales: el dominio de unión a RNA (RBD) y el dominio efector (ED). El dominio RBD está compuesto de 1-73 a.a. Este dominio a su vez contiene una señal de localización nuclear (NLS1) y el sitio unión a la proteína celular PABPI (*Poly-A binding protein I*) que se encuentra en citoplasma, por lo que se puede unir a diferentes tipos de RNA. Por otra parte, el dominio ED (86-204 a.a.) contiene diferentes regiones que permiten interactuar con algunas proteínas del hospedero como: el factor específico de corte y poliadenilación CPSF30 (*Cleavage and polyadenylation-specific factor 30-kDa subunit*), la proteína Cinasa-R (PKR), la Fosfatidil Inositol 3 Cinasa (IP3K), PABPII (localizada en núcleo), el factor de inicio de la transcripción en eucariontes 4G1 (eIF4GI) y además, algunos virus pueden tener en este mismo dominio señales de localización nucleolar (NoLS), señales de exportación nuclear (NES) e incluso otra señal de localización nuclear (NLS2) (Abdelwhab *et al.*, 2013). Ambos dominios se encuentran separados por un *linker* (en la posición 74-85 a.a.) (Fig. 4).

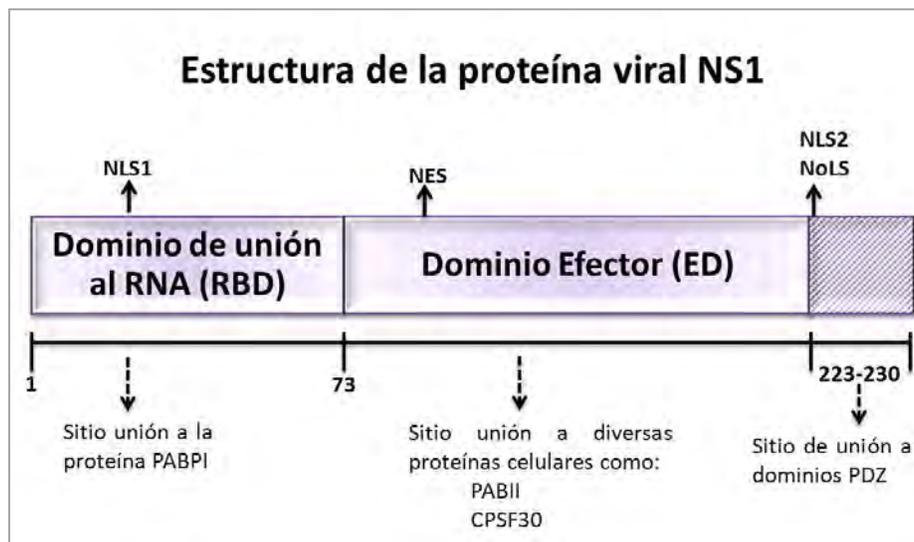


Figura 4. Esquema de la estructura de la proteína no estructural 1 (NS1) del virus de Influenza. En este se representan los dos dominios de la NS1: el dominio de unión al RNA (RBD) compuesto de 1-73 a.a., y el dominio efector (ED) ubicado en el extremo carboxilo, comúnmente compuesto de 74-230 a.a., en este sitio pueden encontrarse variaciones con respecto al tamaño de la secuencia proteica de la NS1 dependiendo de la cepa viral. Tomada y modificada de Hale *et al.*, 2008.



I. 4. 2. Funciones de la NS1

Durante el ciclo de replicación viral ocurren múltiples interacciones de la NS1 con proteínas virales y celulares. En el primer caso, la interacción de ésta con cada componente viral es esencial para la regulación del ciclo de replicación viral. Se ha reportado que la virulencia y patogenicidad del virus se relaciona a ciertas mutaciones de la NS1, la HA y otros componentes de la RNA-polimerasa viral (Abdelwhab *et al.*, 2013).

En el caso de la NS1 existen secuencias consenso que son capaces de unirse a dominios PDZ de la célula y que están relacionados con la patogenicidad de la cepa. Es decir, se conoce que en el extremo carboxilo de la NS1 proveniente de virus altamente patógenos en humanos conservan las secuencias RSKV/RSEV, mientras que la NS1 de virus que afectan a aves tienen ESEV/EPEV (Kuo *et al.*, 2010).

Por otra parte, se sabe que el dominio ED ubicado en el extremo carboxilo de la NS1 es una región que varía entre las diferentes cepas del virus de Influenza. Estas diferencias se reflejan en el mecanismo que media la NS1 para bloquear la producción del IFN y en consecuencia inhibir la respuesta antiviral (Krug, 2015). Por un lado, la NS1 bloquea la activación de los factores de transcripción del gen de IFN como: IRF-3 y NFκB, y en consecuencia los convierte en represores transcripcionales para el gen de IFN (IFN-β). Sin embargo, este mecanismo de inhibición por parte de la NS1 no se lleva a cabo en todos los subtipos de Influenza tipo A ya que cada cepa puede presentar diferencias en la secuencia del dominio ED y en consecuencia existen diferencias funcionales (Kuo *et al.*, 2010). Por un lado, la NS1 de cepas aviarias (H5N1/H9N2) es capaz de bloquear a los factores de transcripción para el gen de IFN (IFN-β) como: NFκB, AP-1 e IRF-3. Por otra parte, de los virus que infectan a humanos, la NS1 de sólo algunas cepas estacionales del subtipo H1N1, así como, la NS1 del virus pandémico (2009), también inhiben la activación del IFN a través de IRF-3 y NFκB; sin embargo, la NS1 de los subtipos H3N2 y H2N2 u otros virus estacionales H1N1, no lleva a cabo este mecanismo. Esta diferencia funcional se atribuye a un cambio en la posición 196 de la cadena peptídica (dominio ED). Las NS1 que bloquean a IRF-3 y NFκB tienen Ácido Glutámico (E) en esa posición. En contraste, la NS1 de las cepas que no bloquean la activación del IFN a través de este mecanismo tienen Lisina (K). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que este sitio sea de unión a ciertas proteínas,



y que en consecuencia, la unión resulte en la activación o inhibición de IRF-3 (Kuo, 2010) (Krug, 2015).

Por otra parte, la NS1, a través de su dominio RBD, es capaz de unirse a RNA de doble cadena para bloquear la transcripción de genes antivirales u otros sensores antivirales como: PKR (Proteína cinasa R) y OAS (2'-5'-Oligoadenilato Sintetasa, 2'-5'-OAS), ambos son reguladores de la transcripción y traducción de genes antivirales, como RIG-I. La NS1 interacciona con otras proteínas como: CPSF30 y PABII, ambas proteínas participan en la maduración de varios tipos de RNAm celular, incluyendo el RNAm del IFN, en la adición de la *cap* y la cadena de poli-A. Esta interacción impide la maduración de los RNAm celulares y por ende bloquea su exportación hacia el citoplasma y, en su lugar, promueve la *cap* y poliadenilación del RNAm viral, favoreciendo la exportación de los mensajeros virales. Además el dominio efector de la NS1 también interacciona con la IP3K (Fosfatidil Inositol Cinasa 3) para inhibir la activación de la apoptosis (Abdelwhab *et al.*, 2013). Este mecanismo, como en el caso anterior, no se lleva a cabo en todas las cepas de Influenza. La inhibición del procesamiento del pre-RNAm del IFN se lleva a cabo a través de la unión del dominio ED con la proteína celular CPSF30, y es modulado por la NS1 de los subtipos H3N2 y H2N2, que recordemos, no inhiben la activación de IRF-3. Se ha reportado que la NS1 del subtipo H1N1 pandémico, no se une a esta subunidad debido a que su secuencia carece de tres aminoácidos que se requieren para la interacción, sin embargo, al restaurar el sitio de unión a CPSF30 se incrementa la replicación del virus. Por lo tanto, las NS1 que carecen de una secuencia consenso óptimo para la unión con CPSF30, conlleva a una disminución en la replicación viral, como en el caso de los subtipos aviáres H7N9 y H5N1, este último aislado en Hong Kong en 1997. Sin embargo, al reemplazar la secuencia consenso de la NS1 para favorecer su unión a CPSF30, ocurrió un aumento en la replicación viral y letalidad de este. La NS1 de cepas aviáres (H5N1) aisladas en humanos posteriormente, mantienen una secuencia consenso en la posición 103-106, óptima para la unión con CPSF30 (Krug, 2015).

En base a lo anterior, las proteínas NS1 provenientes de cepas aisladas en humanos, se clasifican en tres categorías de acuerdo al mecanismo empleado para la inhibición del IFN (Krug, 2015):



- 1) Las NS1 que bloquean la activación de IRF-3 inhibiendo la transcripción del IFN y el procesamiento del pre-RNA_m de éste uniéndose a CPSF30. Ambos procesos se llevan a cabo por la NS1 de algunas cepas del subtipo H1N1 antes del 2009, y, algunas cepas del subtipo H5N1 después de 1997.
- 2) Por otra parte, la NS1 de algunas cepas sólo lleva a cabo uno de los dos mecanismos, ya se bloqueando la activación de IRF-3 y la transcripción del IFN, como es el caso de los virus pandémico H1N1 del 2009.
- 3) O bien, inhibiendo el procesamiento del pre-RNA_m a través de la unión con CPSF30, como los subtipos H3N2, H2N2 y algunas cepas del subtipo H1N1, después del 2009.

I. 4. 3. Modificaciones post-traduccionales de la NS1

La NS1 es una proteína multifuncional que modula múltiples procesos durante la infección viral, es una proteína pequeña de tan solo 25 kDa, pero su flexibilidad funcional está dada por las diversas modificaciones post-traduccionales que sufre a lo largo del ciclo de replicación viral. En un reporte se empleó como modelo de estudio a un virus de influenza recombinante (A/Udm/72), para determinar las implicaciones de la fosforilación de la NS1 en el ciclo de replicación viral. Los autores determinaron que la NS1 es fosforilada por la proteína PKC α en varios residuos de T/S, y esta modificación impactaba en la eficiencia de replicación viral, de manera positiva o negativa, dependiendo de la posición. En contraste, se reportó que en la NS1 del virus pandémico del subtipo H1N1 (2009) no se fosforiló en residuos de T/S; lo que sugiere que la fosforilación no tiene efecto directo en la replicación de este virus (Hsiang *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha reportado que la NS1 es modificada post-traduccionamente por dos miembros del grupo de proteínas UBL (proteínas que tienen estructura terciaria similar a la ubiquitina): ISG15 (*IFN-stimulated gene 15*), y SUMO (*small ubiquitin-like modifier*). En el primer caso, la unión de la NS1 con ISG15 se denomina ISGilación, y es un mecanismo de respuesta antiviral, ya que esta modificación evita que la NS1 interactúe con la α -carioferina celular, y en consecuencia no se importe al núcleo celular. Además, la NS1 al unirse con ISG15, cambia su estructura tridimensional, y esto afecta su actividad para bloquear al IFN, por lo que el virus no puede replicar (Zhao *et al.*, 2009). En contraste, la conjugación de la NS1 con la proteína



SUMO-1 (SUMOilación), promueve la capacidad de la NS1 para bloquear la respuesta del IFN (Santos *et al.*, 2013).

I. 5. Generalidades de los cuerpos de PML (PML-NBs) y la maquinaria de SUMOilación celular

Los cuerpos de PML o también conocidos como ND10 (*Nuclear Dot 10*), son subestructuras nucleares con un diámetro de 0.2-1 μ m, y según el tipo celular, se pueden encontrar de 2-30 en una sola célula. Los cuerpos de PML están implicados en la regulación de diversas funciones celulares como: reparación de daño al DNA, oncogénesis, respuesta celular a estrés, apoptosis, ciclo celular, señalización hormonal, regulación en la transcripción y respuesta antiviral. Se sabe que en los PML-NBs se encuentra la maquinaria de SUMOilación celular, y se ha descrito que durante la infección viral ocurre una reorganización de estas subestructuras nucleares a través de la SUMOilación y deSUMOilación de algunos componentes de los PML-NBs (Everett & Chelbi-Alix, 2007) (Groffroy & Chelbi-Alix, 2011) (Everett *et al.*, 2013) (Chang *et al.*, 2014) (Maroui *et al.*, 2014) (Maarifi *et al.*, 2009).

I. 5. 1. Sistema de SUMOilación celular

La SUMOilación es una modificación post-traducciona que consiste en la conjugación de miembros de la familia SUMO (*Small Ubiquiti-like Modifier*) en residuos de Lisina de la proteína blanco. Hasta la fecha se han descrito cuatro parálogos de SUMO en mamíferos: SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 y SUMO-4. La SUMO-1 es un oligopeptido de 11-12 kDa y únicamente comparte el 50% de similitud con SUMO-2 y SUMO-3, por su parte éstas dos proteínas difieren entre sí sólo en tres residuos en el extremo amino terminal, por lo que comúnmente se hace referencia como SUMO-2/3; ésta proteína tiende a formar polímeros o cadenas en la proteína blanco, y por el contrario, la SUMO-1 funciona como terminador. La proteína SUMO-4, se detectó en condiciones de estrés celular extremo y se propuso en base a análisis de secuencias de DNA, en donde se observó que comparte el 87% de similitud con SUMO-2; sin embargo, podría ser un pseudogen puesto que carece de intrones, además no se detectó de manera endógena (Wilkinson & Henley, 2010).

Las proteínas SUMO se unen covalentemente a otras proteínas, esta interacción produce un cambio en la función, estabilidad o cambio de localización intracelular de las proteínas blanco, o bien, puede promover la interacción con otras proteínas. Por lo tanto, el sistema



de SUMOilación está involucrado en la regulación de múltiples mecanismos celulares como: regulación de la transcripción, reparación de DNA, formación y maduración de los PML-NBs (Wilkinson & Henley, 2010) (Everett *et al.*, 2013).

I. 5. 2. Mecanismo de SUMOilación celular

El sistema de SUMOilación se lleva a cabo en el núcleo celular, y a continuación se describen los eventos necesarios para que pueda ocurrir esta modificación post-traducciona en la proteína blanco (Fig. 5) (Wilkinson & Henley, 2010) (Everett *et al.*, 2013):

- a) La proteína SUMO es un precursor inactivo, por lo tanto, previamente debe ser procesada a su forma activa. Esto es llevado a cabo por acción específica de las proteasas específicas para SUMO (SENPs). Estas cortan en el motivo di-Glicina (Gly-Gly) del extremo carboxilo de la SUMO.
- b) Posteriormente, en un residuo de cisteína (C) en el extremo carboxilo de SUMO se une el heterodímero E1 (conformado por las proteínas SAE1-SAE2) a través de un enlace tioéster, dependiente de ATP.
- c) Una vez ocurrido esto, la proteína SUMO se encuentra en su forma activa, y en este estado, la proteína E2, también denominada Ubc9, es capaz de unirse a SUMO en residuos de Cisteína.
- d) La proteína Ubc9 por sí sola puede unirse en residuos de K de la proteína blanco, sin embargo, la unión de Ubc9 con E3 le da especificidad por el sustrato, además, éste en su mayoría tienen un motivo consenso: Ψ -Lys-Xaa-Asp/Glu (Ψ : aminoácido hidrofóbico/ Xaa: cualquier aminoácido).
- e) La SUMOilación es un proceso dinámico y reversible, y las enzimas SENPs son encargadas de modularlo de manera que las SENPs cortan a la SUMO del sustrato, este proceso se conoce como desconjugación. Una vez que la proteína SUMO se libera puede ser reintegrada al ciclo.

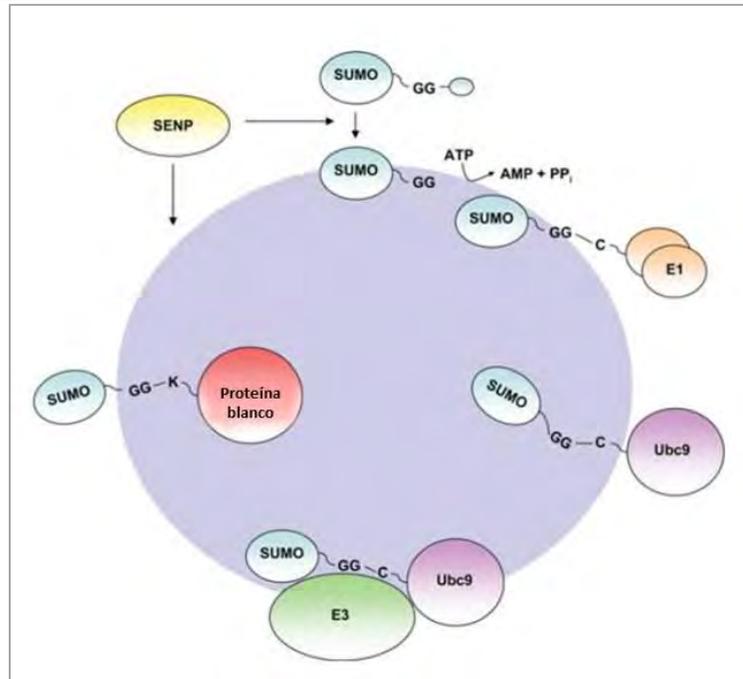


Figura 5. Sistema de SUMOilación celular. En el esquema se ilustran los pasos que involucran la conjugación de SUMO en residuos de lisina de la proteína blanco. Tomada y modificado de Wilkinson & Henley (2010).

I. 6. Diálogo molecular entre los componentes del virus de Influenza y el sistema de SUMOilación celular

En la infección por el virus de Influenza se ha reportado un aumento del sistema de SUMOilación celular, y como en el caso de algunos otros virus, Influenza recluta esta maquinaria para favorecer la replicación viral (Santos *et al.*, 2013).

Previamente se demostró que las proteínas NS1, M1, NP, PB1 y NS2, son modificadas por adición de SUMO durante la infección viral, aunque se desconocía el impacto de la SUMOilación en éstas (Pal *et al.*, 2010) (Pal *et al.*, 2011).

Más adelante, se reportó que la proteína M1 se une a SUMO en la K42. La SUMOilación de la M1 se requiere para que las vRNPs puedan exportarse del núcleo al citoplasma de la célula. En relación a esto, estudios previos han demostrado que las vRNPs se transportan del núcleo al citoplasma junto con M1 en forma de complejo (vRNP-M1), y esta interacción determina la morfología del virus; como los autores lo demostraron, los virus WT (*Wild Type*) liberan partículas de forma esférica, en contraste, los mutantes que carecen del sitio de unión a SUMO, producen partículas en forma elongada, y además hay una reducción en la producción de partículas virales. Por lo tanto, los autores sugieren que el



desarrollo de moléculas que bloqueen la SUMOilación de M1 pueden ser drogas potenciales para el tratamiento de Influenza (Wu *et al.*, 2011).

En otro reporte, se mostró que la NS1 de la cepa aviar H5N1 altamente patógena (HPAI) H5N1, interacciona con la Ubc9 (un componente del sistema de SUMOilación), y además es modificada por SUMO-1; la desconjugación de SUMO fue mediada por la SENP1. Se observó, que la SUMOilación de la NS1 aumentó la estabilidad de la proteína y en consecuencia se aumentó la replicación viral. Los autores demostraron que la SUMOilación se conserva en diferentes cepas que infectan a humanos y aves, siendo el sitio de modificación las lisinas: K219/K221, y en algunas otras K219/217; a excepción del subtipo H1N1 pandémico (2009), ya que carece de 11 aminoácidos en el extremo carboxilo, entre éstos el sitio de unión a SUMO-1 (K219) (Xu *et al.*, 2011).

Por otra parte, en otro estudio se observó que la NS1 (PR8) (A/Puerto Rico/8/1934), que infecta a humanos, interacciona con las proteínas SUMO-1 y SUMO-2/3. Los sitios de unión a SUMO fueron: K70/K219, mismos que se encuentran conservado en algunas cepas del subtipo H1N1 y H2N3. Los autores demostraron que la NS1 es SUMOilada y que esta modificación es necesaria para que la NS1 tenga la actividad como antagonista del IFN. Por otra parte, la SUMOilación de la NS1 se relacionó con la abundancia de dímeros y trímeros de ésta durante la infección viral, esto es relevante ya que la dimerización de la NS1 se requiere para que se pueda unir al RNA y así bloquear la respuesta del IFN, además, en esta configuración la NS1 puede interactuar con otras proteínas del hospedero (Santos *et al.*, 2013).

En el caso de la proteína viral NP, un componente del complejo de la RNA-polimerasa viral también es SUMOilada, principalmente por SUMO-1 en dos residuos de lisina (K7/K4) del extremo N-terminal. La conjugación de SUMO a NP en la K7 es indispensable para que el virus se pueda replicar, por lo que este residuo se conserva en los diferentes subtipos de Influenza, incluyendo el H1N1. Por otra parte, la SUMOilación de la NP favorece su tráfico intracelular favoreciendo la multiplicación del virus (Han *et al.*, 2014).



II. ANTECEDENTES

En la infección por diferentes virus de RNA, como el virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) (RNA⁻_{ss}) y Encefalomiocarditis (EMCV) (RNA⁺_{ss}), se ha observado que se aumenta la SUMOilación de los factores de transcripción IRF-3 (K152) e IRF-7 (K406), este incremento se correlaciona con la disminución en la expresión del gen de *ifn-1*, sugiriendo que la SUMOilación de IRF-3 e IRF-7 es uno de los mecanismos por los que en algunas infecciones virales se regula negativamente la expresión del gen de *ifn-1* (Kubota *et al.*, 2008).

En otro estudio, se reportó que la proteína VP35 del virus de Ébola Zaire (EVOB) (RNA⁻_{ss}) interacciona con el sistema de SUMOilación celular promoviendo la SUMOilación de IRF-3/IRF-7 antes y después de su activación, y de esta manera inhibir la transcripción del IFN-I. La conjugación de SUMO con IRF-7 ocurrió en múltiples residuos de Lisina además del previamente reportado (K406) (Chang *et al.*, 2009).

En la infección con virus Sendai (SeV) (RNA⁻_{ss}), la proteína IRF-3 se une a SUMO-1 y esta unión favorece la estabilización de la IRF-3; sin embargo, la proteína SENP2 favorece la deSUMOilación de ésta, y promueve su Ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma. De esta manera SENP2 regula negativamente la activación del IFN-I. Además, se observó que la SUMOilación y Ubiquitinación son procesos competitivos entre sí, y la IRF-3 es blanco de ambas modificaciones post-traduccionales en la K87 que se encuentra conservado en humanos (Ran *et al.*, 2011).

El virus del herpes KSHV (*Human Herpesvirus type 8 HHV-8*) (DNA_{ds}), interacciona con la maquinaria de SUMOilación celular en diferentes etapas del ciclo de replicación viral, favoreciendo la evasión de la respuesta antiviral. La proteína viral K-bZIP, es un represor transcripcional de manera dependiente de SUMO, es decir: la K-bZIP es SUMOilada por SUMO-2/3, una vez modificada, induce la SUMOilación de IRF-7, IRF-1 e IRF-2 convirtiéndolos en represores transcripcionales; por otro lado, la K-bZIP bloquea la unión de la IRF-3 con el promotor del IFN-β, de manera independiente SUMO, convirtiéndolo en represor transcripcional (Chang & Kung, 2014).

Los virus de Influenza interaccionan ampliamente con el sistema de SUMOilación celular durante el ciclo de replicación viral. Una de las estrategias para contender con la respuesta



antiviral de la célula es a través de la interacción de la NS1 con SUMO (Xu *et al.*, 2011) (Santos *et al.*, 2013), ya que se ha reportado que la NS1 inhibe la activación de los factores de transcripción del gen de IFN como: IRF-3 y NF κ B. Sin embargo, se desconoce a detalle el mecanismo molecular por el cual la NS1 modula la respuesta del IFN-I en los diferentes subtipos de Influenza (Kuo, 2010; Krug *et al.*, 2015).

III. HIPÓTESIS

En la infección por Influenza H1N1 tipo A (estacional y pandémica), la proteína viral NS1 induce la SUMOilación de la IRF-3 convirtiéndola en un represor transcripcional para el gen de IFN-I.

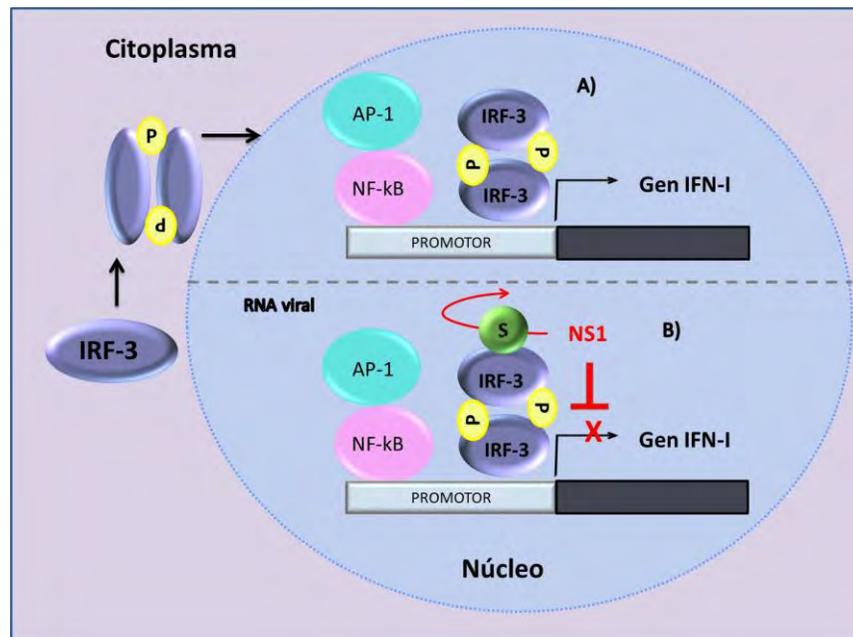


Figura 6. Esquema hipotético de la regulación de IRF-3 mediado por la NS1 durante la infección viral.

A) Se sabe que la proteína IRF-3 en condiciones basales se encuentra en citoplasma, sin embargo, en respuesta a la infección por el virus de Influenza se fosforila y se transloca al núcleo. En esta conformación se asocia al promotor del IFN, junto con otros factores de transcripción como AP-1 y NF-kB, y se promueve la transcripción del gen de IFN-I (α/β). B) En nuestro modelo, nosotros proponemos que durante la infección viral la NS1 induce la SUMOilación de la IRF-3, convirtiéndola en un represor transcripcional para el gen de *ifn*, y de esta manera inhibir la respuesta antiviral.



IV. OBJETIVOS

IV. 1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la NS1 sobre el estado de activación de la IRF-3.

IV. 2. Objetivos particulares

IV. 2. 1. Analizar la distribución intracelular de las proteínas celulares IRF-3, SUMO-1, y la proteína viral NS1 en células infectadas con Influenza H1N1 estacional y pandémica.

IV. 2. 2. Analizar la expresión de la proteína celular IRF-3 y la proteína viral NS1 durante la infección viral mediante ensayos de Western blot.

IV. 2. 3. Determinar el estado de activación de la IRF-3 (Fosforilación o SUMOilación) en células infectadas por Influenza H1N1 mediante ensayos de Inmunoprecipitación y Western blot.

IV. 2. 4. Evaluar el efecto de la proteína viral NS1 sobre la activación de IRF-3 en células transfectadas con pcDNA-NS1 y pcDNA-SUMO-1 y en células transfectadas e infectadas con Influenza H1N1.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V. 1. Células y virus

Se emplearon células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) para la amplificación y titulación del virus de Influenza estacional (H1N1/A/New Caledonia/99) y pandémico (H1N1/A/México/09). Ambos virus se propagaron utilizando una MOI (Multiplicidad de Infección): 0.01 PFU/cel (Unidades Formadoras de Placa) durante 2 hrs a 37°C con 1.2 µg/mL de Tripsina (*Invitro*) en agitación cada 10 min. Posteriormente el inóculo se desechó y se agregó medio suplementado con 1% de suero bovino fetal (*Biowest*). La cuantificación de partículas virales se llevó a cabo por la Técnica de Ensayo en Placa como se describe a continuación: la monocapa de células MDCK se infectó con diluciones seriadas del virus. La adsorción se llevó a cabo durante de 2 hrs, posteriormente se adicionó medio suplementado con agar noble (*BD DifcoTM*), después de 72 hrs se removió el agar y la monocapa celular se tiñó con una solución de cristal violeta 20% Etanol durante 24 hrs a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se removió la solución y las placas

se lavaron con agua corriente. Posteriormente se observaron y se cuantificaron las placas líticas con el fin de obtener el título viral. Los cálculos realizados para la obtención del título viral se muestran a continuación. A partir de los cálculos obtenidos, los experimentos posteriores fueron realizados a una MOI: 5 PFU/cel.

(Número de placas) (1×10^x) (Factor de Dilución) = unidades formadoras de placa/cel

$$(5) (1 \times 10^4) (2) (1.1) = 1.1 \times 10^5$$

$$(40) (1 \times 10^3) (2) (1.1) = 8.8 \times 10^4$$

$$\text{Título Viral} = 9.9 \times 10^4 \text{ PFU/mL}$$

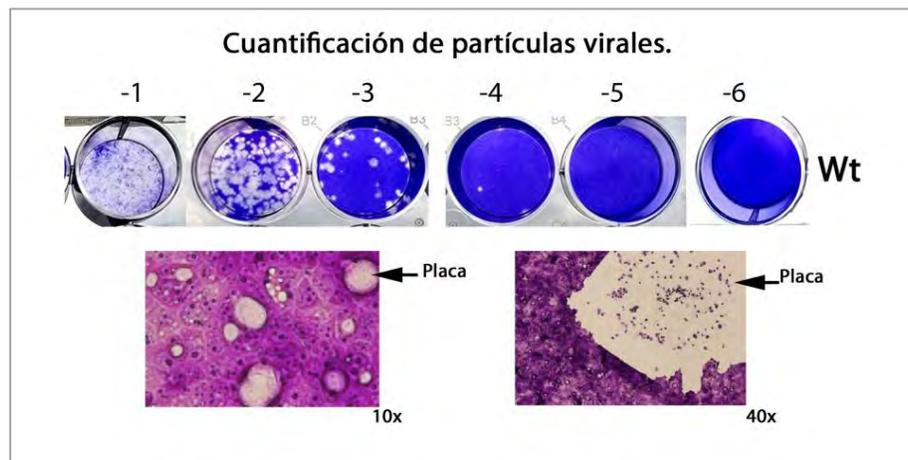


Figura 7. Ensayo en placa en células MDCK. En la monocapa de células MDCK, se observó la formación de placas líticas por la infección con Influenza H1N1/A.

Paralelamente, como modelo experimental se emplearon células A549 (*Human lung adenocarcinoma epithelial cell line*), las cuales fueron infectadas a las 8, 12, 16 y 24 hpi (horas post-infección). Ambas líneas celulares, MDCK y A549, se mantuvieron en medio DMEM 1X (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (*Gibco/BRL*), suplementado con 10% de suero bovino fetal (*Biowest*), adicionado con 1% de penicilina-estreptomicina (*Invitro*). Las células se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂. Las células A549 fueron utilizadas para realizar todos los ensayos descritos a continuación.

V. 2. Ensayos de Inmunofluorescencia

Para analizar la dinámica de distribución de las proteínas celulares IRF-3, SUMO-1 y la proteína viral NS1 a lo largo del ciclo de replicación, se infectaron células A549 con virus de Influenza estacional y pandémico, respectivamente. En ambos casos, el procedimiento de los ensayos de Inmunofluorescencia fue el siguiente: las células se fijaron a las 12 y 24



hpi con 3.7% de paraformaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después se realizaron 3 lavados con PBS 1X (0.18 mM K₂HPO₄; 0.43 mM Na₂HPO₄; 0.27 mM KCl; 13.7 mM NaCl; pH 7.4). Las células se permeabilizaron con PBS 1X-5% Tritón X-100, y se mantuvieron en agitación durante 15 minutos, y luego se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Después se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios toda la noche a 4°C: anti IRF-3 policlonal (1: 1 000, *Santa Cruz*), anti SUMO-1 monoclonal (21c7) (1: 1 000, *Invitrogen*) y anti NS1 policlonal (1: 3 000, *Gene Tex*). Posteriormente las células se lavaron 3 veces con PBS 1X, y se incubaron con el anticuerpo secundario peroxidado acoplado a un fluoróforo anti-IgG de ratón-Alexa 568 (1: 2 500) junto con anti-IgG de conejo-Alexa 488 (1: 1 500) (ambos de *Invitrogen*), durante 2hrs a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces y se incubaron 5 minutos con DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole; 1: 10 000, *Sigma*) usado como marcador nuclear. Se realizaron 3 últimos lavados con PBS 1X. Las muestras fueron montadas en portaobjetos con PBS-10% glicerol, y se observaron con un microscopio confocal (*Leica*) con el objetivo 63X y tres láser en: 405nm (DAPI), 488nm (FITC) y 568nm (Rhodamina).

V. 3. Extracción y cuantificación de proteínas totales

Para la obtención de los extractos de proteínas totales, las células A549 se infectaron a una MOI: 5PFU/cel y posteriormente se cosecharon a las 8, 12, 16 y 24 hpi. El homogenizado celular se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos, el pellet se lavó con PBS 1X y se resuspendió en 200 µL de buffer de lisis RIPA (150mM NaCl; 50mM Tris pH8; 0.1% SDS (Dodecilsulfato de Sodio); 0.5% Deoxicolato de sodio; 5mM EDTA pH 7.5; NP40 1%; Inhibidor de proteasas 1X (*Complete*)), se incubó durante 30 minutos en hielo. Posteriormente el homogeneizado se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se recolectó el sobrenadante (fracción soluble), y se cuantificó la cantidad de proteínas totales usando un reactivo similar al método de Lowry (*Bio-Rad DC protein Assay*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de proteínas se ajustó a 20 µg en base a una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA 1-5 µg/mL, *Sigma*).

V. 4. Inmunodetección de proteínas (SDS-PAGE y Western blot)

Las proteínas obtenidas de cada extracto celular se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (*Bio-Rad*) al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF



(Polyvinilidene fluoride, *Amersham*) por electrotransferencia en una cámara semi-seca (*Trans-Blot SD Semy-dry Transfer cell, BioRad*) a 120 miliamperios por 2 hrs. La membrana se bloqueó con 0.5% de BSA durante 2hrs en movimiento a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces con solución de lavado TBS 1X-0.1% Tween (50 mM Tris-Cl pH 7.6; 150 mM NaCl), durante 10 minutos en movimiento por cada lavado. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario diluido en TBS/0.5%BSA/0.1% Tween, durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti IRF-3 policlonal (1: 1 000, *Santa Cruz*), anti IRF3-P monoclonal (1: 1 000, *Cell signal*), anti SUMO-1 monoclonal (21c7) (1: 1 000, *Invitrogen*) y anti NS1 policlonal (1: 3 000, *Gene Tex*), y anti-GAPDH policlonal (1: 1 000, *Santa Cruz*). Después, la membrana se lavó 3 veces con solución de lavado y se incubó con el respectivo anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa: anti-IgG de ratón, conejo (1: 1000, ambos de *Jackson Immuno Research*) y/o cabra (1: 1 000, *Invitrogen*), durante 2 hrs a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados. La señal se reveló con un sustrato quimioluminiscente (ECL) como lo describe el fabricante (*Invitrogen*), y la membrana se expuso a películas autorradiográficas.

V. 5. Ensayos de Inmunoprecipitación

Se cultivaron $\sim 2.5 \times 10^6$ células A549 en cajas Petri de 100 mm. Cuando las células se encontraba en una confluencia optima $\leq 70\%$ se llevó a cabo la infección a las 12, 16 y 24 hpi a una MOI: 5 PFU/cel con Tripsina 0.25% (*Invitro*), en ausencia de suero. El inoculo se dejó durante 2hrs en movimiento, y posteriormente este se desechó. Se adicionó DMEM 1X suplementado con 10% SBF y se mantuvo a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente las células se cosecharon al tiempo de infección requerido y se obtuvieron los extractos proteicos de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Se cuantificó la cantidad de proteínas totales para cada extracto y se ajustó a 300 µg. Posteriormente se realizaron los ensayos de Inmunoprecipitación para IRF-3 de la siguiente forma:

1. Pre-clareo del extracto proteico: se incubaron los 300 µg de proteína con 20 µL de A-agarosa (*Invitrogen*) durante 1 hora a 4°C en movimiento.
2. Acoplamiento de la A-agarosa al anticuerpo anti-IRF-3 (200 µg/mL, *Santa Cruz*): se utilizaron 20 µL A-agarosa para cada muestra y se resuspendió en 500 µL de



buffer RIPA (con inhibidor de proteasas). Posteriormente, se centrifugó a 6 000 rpm a 4°C durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante y al pellet se le agregó 500 μ L de buffer RIPA y nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones dos veces, en ambos casos el sobrenadante se desechó, y al pellet se le añadieron 500 μ L de buffer RIPA con 1 μ g de anti-IRF-3. Se incubaron durante 1hr a 4°C en movimiento para que la resina se acoplara al anticuerpo. Posteriormente, se centrifugó a 6 000 rpm durante 3 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y al pellet se lavó tres veces con 500 μ L de buffer RIPA, y se centrifugó a 6 000 rpm durante 3 minutos a 4°C. El pellet, que es la fracción de la A-agarosa acoplada al anticuerpo (IRF-3), se resuspendió en buffer RIPA y se adicionaron 100 μ L de A-agarosa acoplada a 300 μ g de extracto de proteínas totales. Se incubaron durante 2 hrs a 4°C en movimiento. Al terminar la incubación se centrifugó a 6 000 rpm durante 3 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y el pellet se lavó 3 veces con 500 μ L buffer RIPA, en cada lavado se centrifugó a 6 000 rpm durante 3 minutos a 4°C.

3. Al final a cada pellet se le añadieron 30 μ L de buffer Laemmli (SDS 6X con β -mercaptoetanol), y las muestras se hirvieron a 95°C durante 5 minutos, al terminar se templaron en hielo inmediatamente y se centrifugaron a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Las muestras se cargaron en un gel de electroforesis de poliacrilamida al 7.5% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), posteriormente se transfirió a una membrana de PVDF por electrotransferencia en una cámara semi-seca. Se realizaron ensayos de Western blot, para lo cual, las membranas se bloquearon con BSA 0.5% durante 1hr a temperatura ambiente. Después se lavó 3 veces con solución de lavado (TBS-0.1% Tween). Para detectar si la IRF-3 estaba siendo modificada post-traduccionalmente se llevó a cabo la inmunodetección contra anti-SUMO-1 monoclonal (21c7) (1: 1 000, *Invitrogen*). A partir de los mismos extractos proteicos obtenidos, la cantidad de proteínas totales se ajustó a 20 μ g y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE), se realizó la electrotransferencia y se realizaron ensayos de Western blot para la Inmunodetección contra IRF3 total, IRF3-P, NS1 y GAPDH como se describió anteriormente.



V. 6. Extracción y purificación del DNA plasmídico (pcDNA) de SUMO-1, NS1 y GFP

Con el objetivo de evaluar el efecto de la NS1 sobre el estado de activación de IRF-3, nosotros obtuvimos el pcDNA de SUMO-1, NS1 y GFP (como control) como se describe a continuación: en 20mL de medio LB (*Miller's LB Broth Base, Invitrogen*) se cultivaron 100 μ L de *E.coli* (DH5- α) transformadas con el respectivo plásmido (SUMO-1, NS1 y GFP). Al medio se le adicionó 100 μ L de Ampicilina (100 μ g/mL) para seleccionar a la cepa de interés. El cultivo se dejó crecer a 37°C durante toda la noche. El medio se recuperó y se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y el pellet se utilizó para la extracción y purificación del pcDNA con un kit comercial (*QUIAGEN Plasmid Purification*) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una vez que se obtuvo el pcDNA, se lavó con Isopropanol absoluto y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se lavó con Etanol-70% y se repitió el mismo procedimiento. Al final el pellet se resuspendió en 100 μ L de buffer TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA). Posteriormente, se midió la absorbancia de cada muestra para determinar la pureza de acuerdo con la relación $A_{260}/A_{280} \leq 1.8$, y la concentración del DNA utilizando un nanodrop (*Thermo Scientific, NanoDrop 2000*). Los datos obtenidos se muestran en la sección del apéndice (Fig. A.1). Una vez que se corroboró que las muestras eran puras, se ajustó la concentración de cada una de estas a 6 μ g, y esta cantidad fue la que se utilizó para realizar los ensayos de Transfección, como se describe a continuación.

V. 7. Ensayo de Transfección en células A549

Se cultivaron $\sim 2.5 \times 10^6$ células A549 en cajas Petri de 100 mm y se mantuvieron en medio DMEM 1X con 10% de SBF, y se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂. Una vez que el cultivo se encontraba en una confluencia optima 70-90%, las células se transfectaron con 6 μ g de pcDNA-GFP diluido en 600 μ L de DMEM 1X utilizando un polímero catiónico (*TurboFect Transfection Reagent, Thermo Scientific*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El pcDNA de GFP se empleó para ver la eficiencia de la Transfección (datos no mostrados). Posteriormente, para los experimentos se transfectó con: pcDNA-SUMO-1, pcDNA-NS1 (NS1 estacional) y como control un pcDNA vacío. Después de 24 hrs post-transfección (hpt), se obtuvo el lisado celular y se llevó a cabo la extracción y



cuantificación de proteínas totales de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. La cantidad de proteínas totales por condición se ajustó a 300 µg para realizar los ensayos de Inmunoprecipitación de la IRF-3 como se describió anteriormente. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 7.5% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y se llevaron a cabo ensayos de Western blot contra SUMO-1.

VI. RESULTADOS

VI. 1. Análisis de la distribución intracelular de las proteínas celulares IRF-3, SUMO-1, y la proteína viral NS1 en células infectadas con Influenza H1N1 estacional y pandémica

Con el objetivo de analizar la localización intracelular de las proteínas celulares IRF-3, SUMO-1, y de la proteína viral NS1 a lo largo del ciclo de replicación viral, se realizaron ensayos de Inmunofluorescencia en células A549 infectadas Influenza A/H1N1 estacional (H1N1/New Caledonia/99) y pandémica (A/México/09) (Fig. 8), como se describió en la sección de materiales y métodos. En células A549 no infectadas (mock), la proteína celular IRF-3 se observó en una distribución difusa en el citoplasma de la célula. En células infectadas con el virus H1N1 estacional, a las 12 hpi, la IRF-3 se relocalizó del citoplasma hacia el núcleo de la célula infectada (Fig. 8) en más del 50% de las células (Fig. 9). En contraste, en la infección con el subtipo pandémico a las 12 hpi, la IRF-3 se observó en una distribución difusa tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula infectada (Fig. 8) en más del 90% de las células (Fig. 9). Hacia la fase tardía de la infección (24 hpi), en la infección con el subtipo estacional, la IRF-3 se observó de nuevo en el citoplasma de la célula, con una distribución difusa y de puntos citoplásmicos. En el caso de la infección con el virus pandémico, la IRF-3 se encontró con una distribución difusa en el núcleo y citoplasma de las células infectadas (Fig. 8 y Fig.9).

Por otra parte, en células no infectadas la SUMO-1 se observó difusa en el núcleo de la célula (Fig. 8). En células infectadas con el virus estacional, a las 12 hpi, la SUMO-1 se relocalizó en puntos nucleares en donde colocalizó con la proteína IRF-3 (Fig. 8). En contraste, en células infectadas con el virus pandémico, la SUMO-1 se observó difusa en el núcleo y en el citoplasma, de manera muy similar a lo observado en las células no infectadas y no se observó una clara colocalización con la IRF-3 (Fig. 8). Hacia las 24 hpi,

la SUMO-1 y la IRF-3 colocalizaron en puntos citoplásmicos en la infección con Influenza estacional, a diferencia de la infección con el virus pandémico, en donde la distribución de SUMO-1 e IRF-3 se mantuvo difusa en el núcleo y citoplasma de la célula infectada, y no se observó una colocalización de la SUMO-1 con IRF-3 durante la infección (Fig. 8).

En la fase temprana de la infección, la NS1 de la cepa estacional se localizó preferencialmente en puntos en el núcleo de la célula (Fig. 10). En contraste, en la infección con la cepa pandémica, la NS1 se observó en puntos citoplásmicos y de manera difusa en el núcleo de la célula infectada (Fig. 10). A las 24 hpi, la NS1 tanto de la cepa estacional como de la pandémica se observó en el núcleo de la célula colocalizando con la SUMO-1 en diversos puntos nucleares (Fig. 10).

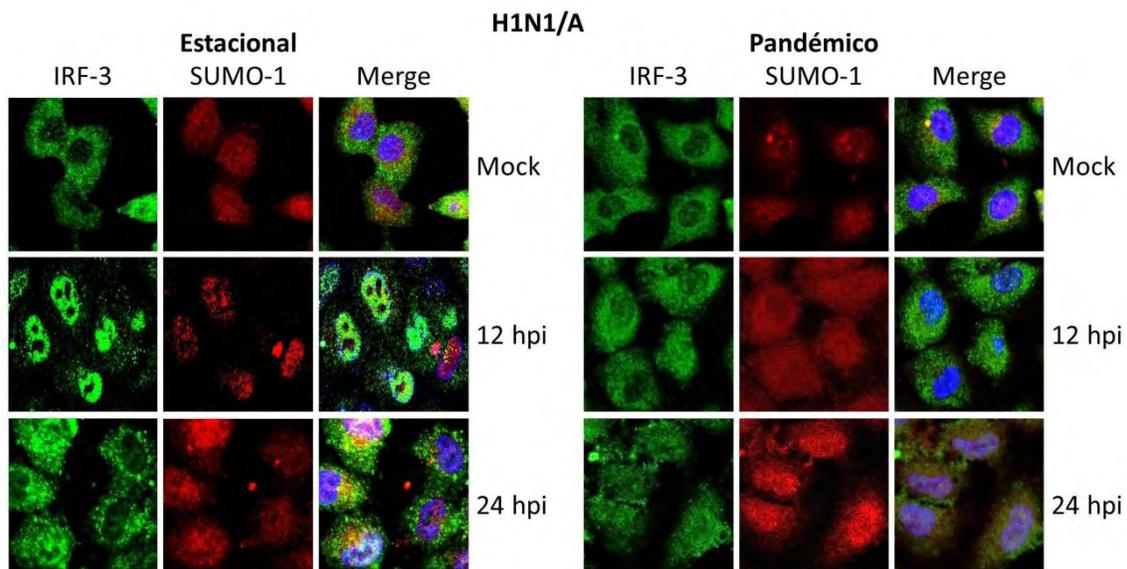


Figura 8. Distribución intracelular de las proteínas celulares IRF-3 y SUMO-1, en células infectadas con Influenza estacional y pandémica. De izquierda a derecha se observa a: IRF-3 en verde, SUMO-1 en rojo, y a DAPI en azul como marcador nuclear. Las células A549 fueron infectadas con el virus de Influenza A (H1N1) estacional (A/New Caledonia/20/99) y pandémico (A/Mexico/09) a una MOI= 5 PFU/cel, respectivamente.

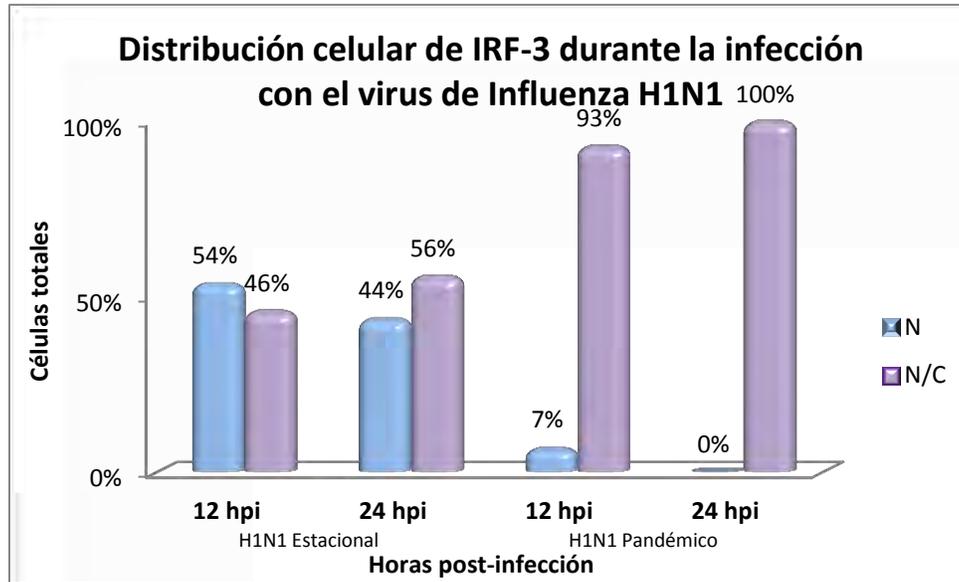


Figura 9. Gráfica que ilustra la distribución de la proteína celular IRF-3 durante la infección con el virus de Influenza H1N1 estacional y pandémico. En células A549 infectadas con el virus estacional, a las 12 hpi la distribución de IRF-3 se observó en el núcleo (N) en el 54% de las células, mientras que el resto de la IRF-3 se localizó de manera difusa entre el núcleo y citoplasma (N/C). No obstante, hacia las 24 hpi hubo un ligero decremento de la IRF-3 en el núcleo (44%), y hubo un incremento (56%) de la IRF-3 difusa entre núcleo y citoplasma. En contraste, en células infectadas con el virus pandémico tanto a las 12 y 24 hpi en más de un 90% de las células la IRF-3 se observó distribuida entre el núcleo y citoplasma.

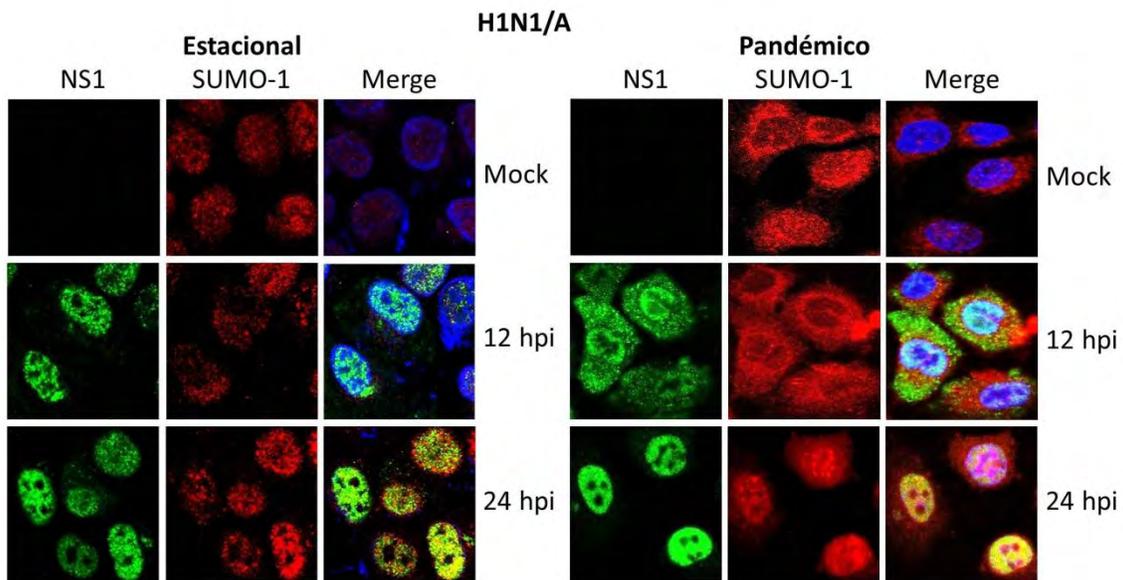


Figura 10. Distribución intracelular de la proteína viral NS1. De izquierda a derecha se observa a la NS1 en verde, la proteína celular SUMO-1 en rojo, y a DAPI en azul como marcador nuclear, en células A549 que fueron infectadas con el virus de Influenza H1N1. Estacional (A/New Caledonia/20/99) y pandémico (A/Mexico/09) a una MOI= 5 PFU/cel, respectivamente.



VI. 2. Expresión de la proteína celular IRF-3 y la proteína viral NS1 en la infección por Influenza H1N1 estacional y pandémica.

Con el objetivo de analizar la expresión de la proteína IRF-3 y la proteína viral NS1 a lo largo del ciclo de replicación viral, se obtuvieron extractos de proteínas totales a partir de células A549 infectadas por Influenza H1N1 (estacional y pandémica) y se analizaron mediante ensayos de Western blot, como se describe en la sección de materiales y métodos. En células no infectadas la IRF-3 se detectó en forma de dos bandas, cuyos pesos moleculares son de aproximadamente 47 y 50 kDa, este patrón de dos bandas se ha observado en diferentes líneas celulares. En células infectadas con la cepa estacional y pandémica, no se observaron diferencias en la expresión de la IRF-3 a lo largo del ciclo de replicación viral. Por otro lado, evaluamos la expresión de la proteína viral NS1, cuyo peso molecular fue de aproximadamente 25 kDa. La proteína viral se detectó desde las 8 hpi en la infección con las dos cepas virales y su expresión se mantuvo hasta las 24 hpi (Fig. 11).

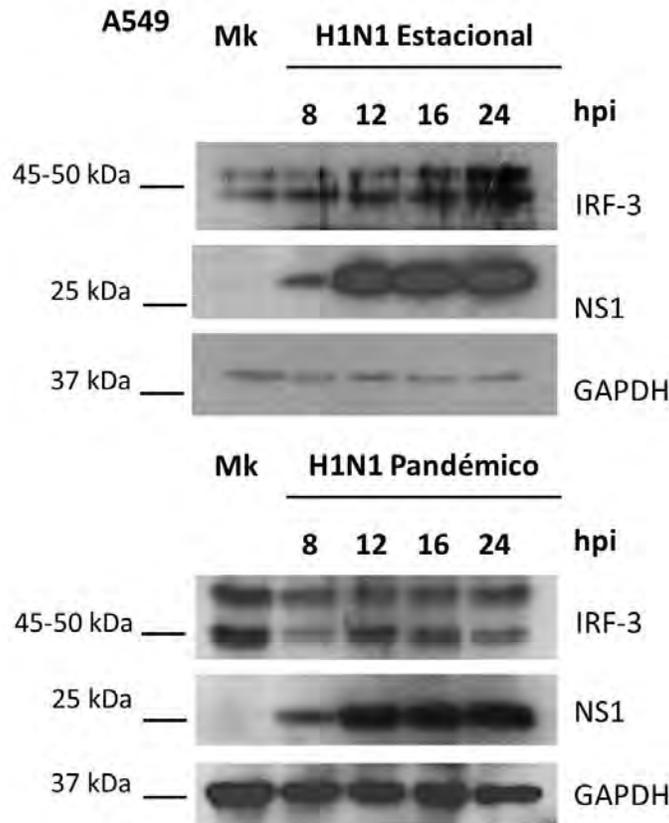


Figura 11. Inmunodetección de la proteína celular IRF-3 (45-50 kDa) y de la proteína viral NS1 (25 kDa). Los extractos totales de células A549 fueron preparados y sujetos a análisis por SDS-PAGE, posteriormente fueron transferidos a membranas PVDF e incubados con los anticuerpos dirigidos a las proteínas IRF-3 (1: 1 000, *Santa Cruz*), NS1 (1: 3 000, *GeneTex*) y GAPDH (1: 1 000, *Santa Cruz*).



VI. 3. La Fosforilación y SUMOilación del factor de transcripción IRF-3.

Con el objetivo de evaluar si la proteína IRF-3 podía ser modificada post-traduccionalmente por SUMOilación y/o fosforilación en la infección con el virus estacional y pandémico, respectivamente, se realizaron ensayos de Inmunoprecipitación a partir de extractos de células infectadas con Influenza (estacional y pandémica), a diferentes tiempos post-infección (12, 16 y 24 hpi), como se describió en la sección de materiales y métodos. Para los ensayos de Inmunoprecipitación se utilizó el anti-IRF-3 para inmunoprecipitar a la IRF-3 y estas muestras fueron analizadas posteriormente mediante ensayos de Western blot en donde se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-SUMO-1. En nuestros resultados, se observaron dos bandas de peso molecular de 72 y 93 kDa aproximadamente, que corresponden a la IRF-3 modificada por la adición de SUMO-1. Las dos bandas también se observaron en células mock, lo que indica que IRF-3 se encuentra SUMOilada en una forma basal. Sin embargo, en un tiempo temprano de la infección con el virus estacional, se observó un incremento en la intensidad de ambas bandas, y es a las 16 hpi cuando se observó una mayor intensidad de la banda de 72 kDa. A las 24 hpi la intensidad de la banda de 72 kDa se observó similar a las de las 12 hpi. A diferencia de la banda de 72kDa, la banda de 93 kDa no cambio a lo largo del ciclo de replicación viral (Fig. 12).

Por otra parte, en la infección con el virus pandémico (Fig. 13), también se observaron dos bandas correspondientes a IRF-3 SUMOilada como se observa en la Figura 12, las cuales tienen un peso molecular aproximado de 72 kDa y 93 kDa, respectivamente. Al igual que en la infección con el virus estacional a partir de las 12 hpi, se observó un aumento en la intensidad de las bandas en comparación con las células no infectadas. En contraste, en la infección con la cepa pandémica, hacia las 16 hpi y 24 hpi, la intensidad de la señal de la IRF-3/SUMO-1 disminuye conforme avanza el ciclo de replicación viral.

En paralelo, se realizaron ensayos de Western blot (Input) a partir de los extractos de proteínas totales que se utilizaron para los ensayos de Inmunoprecipitación, con la finalidad de saber si la IRF-3 estaba siendo fosforilada en la infección por las dos diferentes cepas virales. Como se describió en la introducción, se ha reportado que la IRF-3 es fosforilada en la infección por diversos virus, esta modificación favorece la translocación del factor IRF-3 al núcleo de la célula y de esta manera activa la transcripción de sus genes blanco.



Para realizar los ensayos de Western blot se utilizó un anticuerpo que reconoce específicamente la forma fosforilada de la IRF-3 (IRF3-P), IRF-3 total (IRF3), anti-NS1 (control de infección) y anti-GAPDH (control de carga). En la infección con la cepa estacional (Fig. 12), la proteína IRF-3 fosforilada se detectó en una banda de 55 kDa a partir de las 12 hpi, y se mantuvo hasta las 24 hpi. En contraste, en la infección con la cepa pandémica (Fig. 13), la IRF-3 fosforilada se observó hasta las 16 hpi y se mantuvo a las 24 hpi. Lo que sugiere que la respuesta antiviral de la célula mediada por la IRF3-P inicia a un tiempo más temprano en la infección con la cepa estacional *versus* la cepa pandémica.

La IRF-3 total se observó tanto en células mock como infectadas a las 12, 16 y 24 hpi, en dos bandas correspondientes a IRF-3 en un rango de 45 a 50 kDa. La proteína viral NS1 se detectó desde las 12 hpi en una banda de 25 kDa que se mantuvo a lo largo del ciclo de replicación en la infección con Influenza estacional y pandémica. La banda correspondiente a GAPDH se detectó en 37 kDa, la cual se utilizó como control de carga (Fig. 12 y Fig. 13).

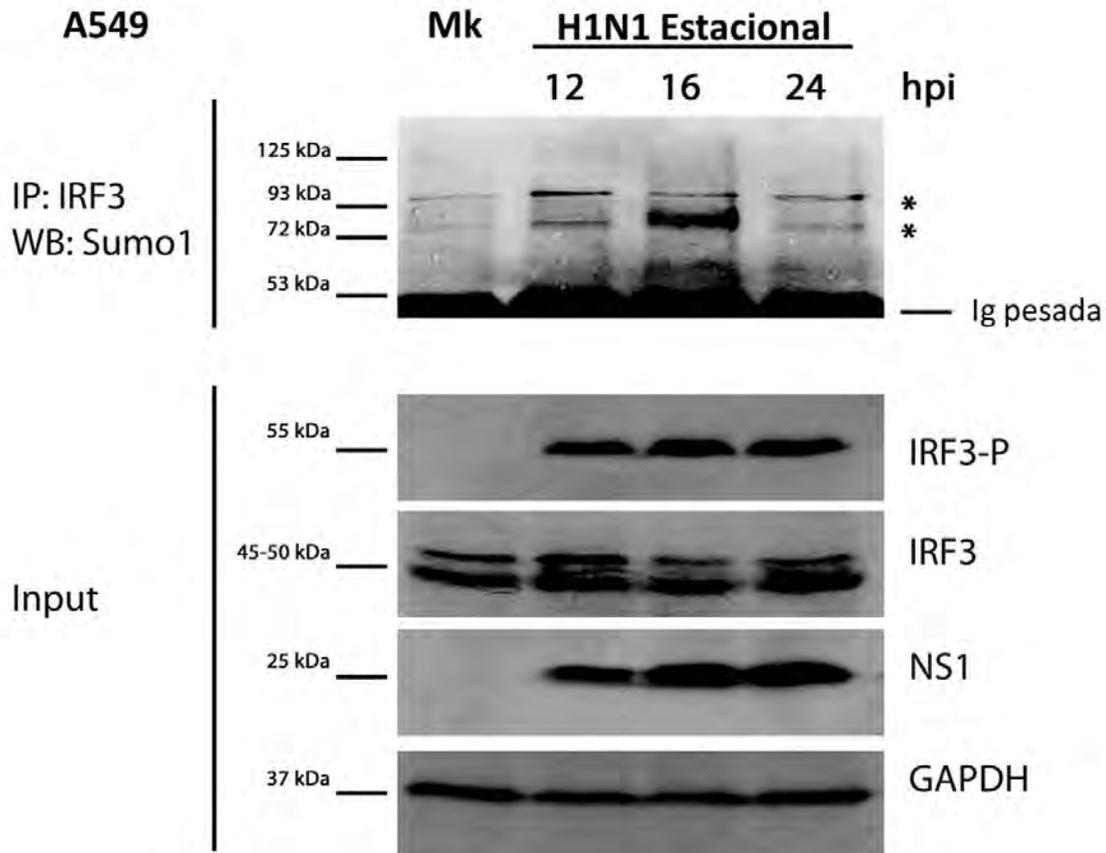


Figura 12. SUMOilación de la IRF-3 en la infección con el virus de Influenza estacional H1N1. Las bandas correspondientes a la IRF-3 conjugada a SUMO-1 se encontraron en dos bandas: 92 y 93 kDa, en células mock e infectadas, en la figura se indican con un asterisco (*). Con los mismos extractos de proteínas totales obtenidos se realizaron ensayos de Western blot para la Inmunodetección de la IRF-3 total, que se encontró en dos bandas de 45-50 kDa y la IRF-3 en su forma fosforilada (IRF3-P, 55 kDa), ésta se detectó desde las 12 hpi y se mantuvo hasta las 24 hpi. La proteína viral NS1 (25 kDa) se utilizó como marcador de infección, su expresión se mantuvo a lo largo del ciclo de replicación. La proteína GAPDH (37 kDa) se utilizó como control de carga.

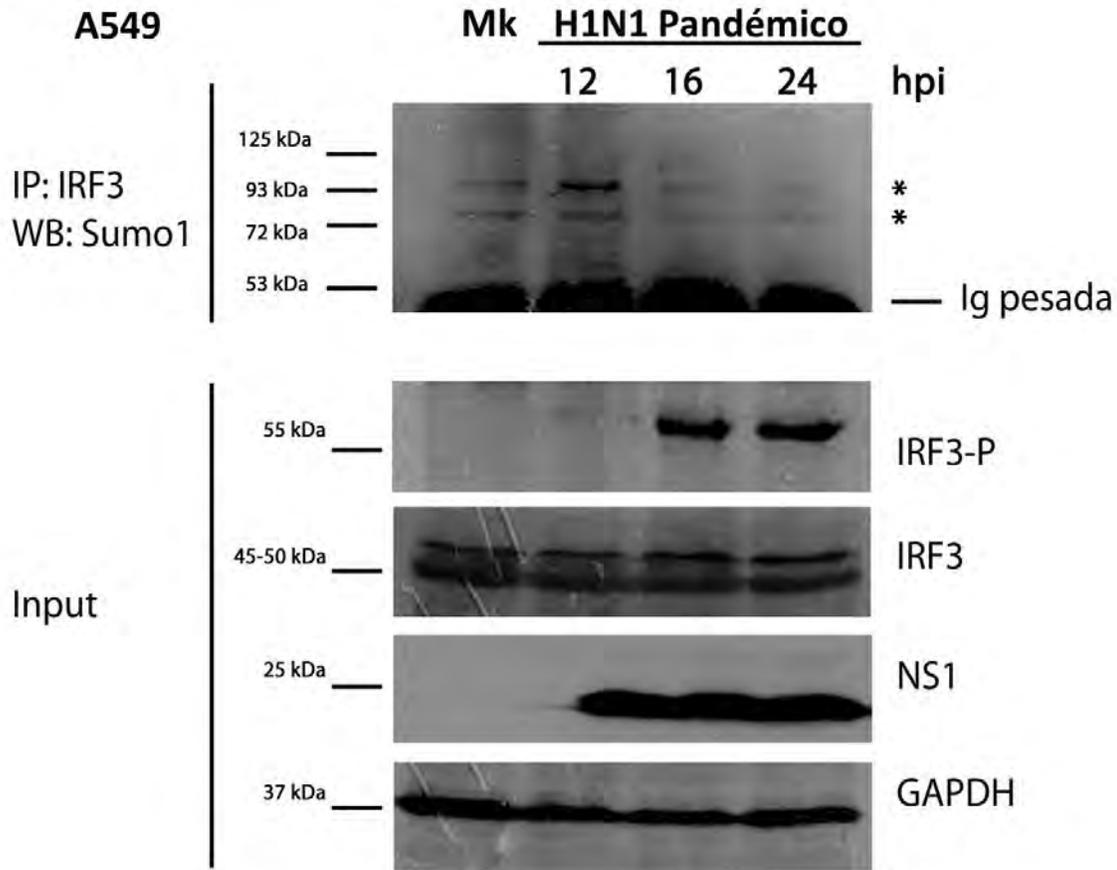


Figura 13. Fosforilación y SUMOilación de la IRF-3 en la infección con el virus de Influenza H1N1 pandémico. Las bandas correspondientes a la IRF-3 conjugada con SUMO-1 se encontraron en dos bandas: 92 y 93 kDa, en células mock e infectadas, en la figura se indican con un asterisco (*). Con los mismos extractos de proteínas totales obtenidos se realizaron ensayos de Western blot para la inmunodetección de la IRF-3 total, que se encontró en dos bandas de 45-50 kDa y la IRF-3 en su forma fosforilada (IRF3-P, 55 kDa), ésta se detectó a las 16 hpi y se mantuvo hasta las 24 hpi. La proteína viral NS1 (25 kDa) se utilizó como marcador de infección, su expresión se mantuvo a lo largo del ciclo de replicación. La proteína GAPDH (37 kDa) se utilizó como control de carga.

VI. 4. Efecto de la proteína viral NS1 sobre IRF-3

Nuestros resultados mostraron que en la infección por Influenza (estacional y pandémica) la IRF-3 es modificada por la adición de SUMO-1 y que además en la infección los niveles de IRF-3/SUMO-1 e IRF-3P se incrementan. La proteína viral NS1 es conocida como la antagonista del interferón, y dado que IRF-3 es un factor de transcripción que induce la expresión del IFN-I, decidimos investigar si la NS1 era responsable de inducir la SUMOilación de la IRF-3 durante la infección. Para lo cual, se transfectaron células A549 con los plásmidos que codifican para la NS1 (pcDNA-NS1) y SUMO-1 (pcDNA-SUMO-1), y se cosecharon las células a las 24 horas post-transfección (24 hpt), se realizaron



ensayos de Inmunoprecipitación (anti-IRF-3) y Western blot (anti-SUMO-1). Resultados preliminares indicaron que la NS1 podría favorecer la SUMOilación de la IRF-3 (Fig. 14), sin embargo, no se sabe si es porque la NS1 tiene la actividad enzimática de E3-SUMO ligasa o porque interacciona con otros componentes de la maquinaria de SUMOilación celular para favorecer la SUMOilación de la IRF-3.

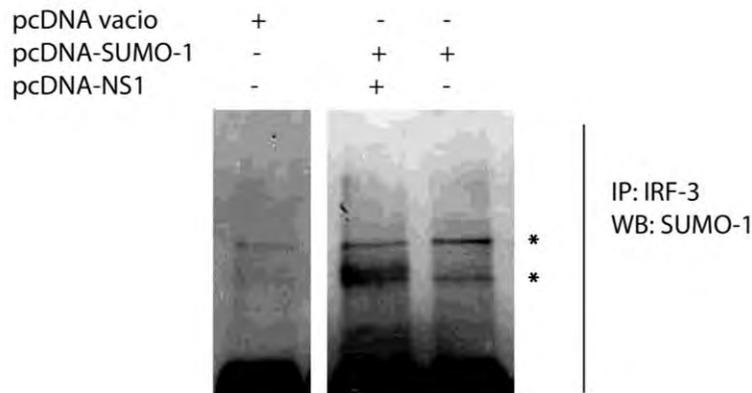


Figura 14. La adición de SUMO-1 a la IRF-3 está influenciada por la proteína viral NS1. Las células A549 fueron transfectadas con el pcDNA vacío, pcDNA-SUMO-1 y/o pc-DNA-NS1 (estacional). Los extractos totales fueron cosechados a las 24 hpt. Las muestras se corrieron en geles de SDS-PAGE al 7.5% y posteriormente se realizó la Inmunodetección utilizando los anticuerpos específicos para detectar a la IRF-3 modificada por SUMO-1. Las bandas correspondientes a la IRF-3-SUMO-1 se muestran marcadas por un asterisco (*).

VII. DISCUSIÓN

Los virus son parásitos intracelulares que interactúan ampliamente con componentes de la célula hospedera, incluyendo a la maquinaria de respuesta antiviral de la célula para evadirla y así completar con éxito su ciclo de replicación viral (Everett *et al.*, 2013). Uno de los mecanismos celulares más utilizados por los virus para modular diversas funciones celulares son las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación y la SUMOilación. Se ha demostrado que en la infección por diversos virus, una de las estrategias para evadir la respuesta antiviral de la célula es a través de la regulación negativa de los factores transcripcionales (IRF-3 e IRF-7) por la adición de SUMO, en consecuencia, se bloquea la expresión del gen de *ifn* (Kubota *et al.*, 2008) (Chang *et al.*, 2009) (Chang & Kung, 2014).



En la infección por el virus de Influenza se ha reportado que la maquinaria de SUMOilación celular es modulada positivamente, es decir, se incrementa la expresión de los componentes del sistema de SUMOilación. Además, la mayoría de las proteínas virales son modificadas por la adición de SUMO-1 o -2/3 y/o interaccionan con alguno de los componentes del sistema de SUMO a lo largo del ciclo de replicación viral. La modificación de la NS1 por SUMO-1 es necesaria para que se inhiba la cascada del IFN-I y tenga su función de antagonista del IFN-I, favoreciendo la generación de progenie viral (Xu *et al.*, 2011) (Santos *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha reportado que la NS1 de algunas cepas del subtipo H1N1, inhiben la activación de los factores de transcripción del IFN como: IRF-3 y NFkB; sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular por el cual la NS1 modula la activación del IFN-I a través de la IRF-3 en los diferentes subtipos de Influenza (Krug *et al.*, 2015). En este proyecto evaluamos el efecto de la NS1 sobre el estado de activación de la IRF-3 en la infección por el virus de Influenza tipo A (H1N1) de una cepa estacional *versus* una pandémica. Por un lado, observamos que en células A549 infectadas con el virus de Influenza estacional en un tiempo temprano de la infección (12 hpi), la proteína celular IRF-3 fue fosforilada y translocada hacia el núcleo de la célula infectada, sitio en donde colocó con la proteína SUMO-1. En contraste, en la infección con la cepa pandémica, en la fase temprana de la infección, la IRF-3 se observó de manera difusa en el núcleo y citoplasma de la célula infectada. No obstante, en la fase tardía de la infección (24 hpi) tanto con la cepa estacional como con la pandémica la IRF-3 se localizó de manera difusa en el núcleo y citoplasma celular (Fig. 8 y Fig.9). Estas observaciones nos sugirieron que en la fase temprana de la infección, el virus pandémico bloqueaba mejor la activación de la IRF-3 en comparación con la cepa estacional. Para demostrarlo, se realizaron ensayos de Western blot en donde se observó a la IRF-3 total e IRF3-P (forma activa y nuclear) tanto en células A549 mock como infectadas con la cepa estacional y pandémica. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de la IRF-3 total no se alteraba en la infección por la cepa estacional ni pandémica (Fig. 11). Sin embargo, la activación de la IRF-3 difería entre la cepa estacional y la pandémica (Fig. 8). La fosforilación de la IRF3, permite que este factor transcripcional sea translocado al núcleo de la célula infectada y active la expresión del gen de *ifn* (Lendock *et al.*, 2014). Se evaluó la fosforilación de la IRF-3 utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente la



fosforilación en la S396 de la IRF-3. Nuestros resultados de los ensayos de Western blot mostraron que en la infección con la cepa estacional, la IRF-3 estaba fosforilada desde las 12 hpi y se mantenía modificada hasta las 24 hpi (Fig. 12), en congruencia a los resultados obtenidos por los ensayos de Inmunofluorescencia, en donde desde las 12 hpi, la IRF-3 se observó re-localizada hacia el núcleo de la célula infectada (Fig. 8). En contraste, en la infección con la cepa pandémica, la señal de la IRF3-P se observó hasta las 16 hpi (Fig. 13) de acuerdo con los resultados de los ensayos de Inmunofluorescencia, en donde nunca se observó a la IRF-3 totalmente relocalizada hacia el núcleo de las células (Fig. 8). Estos resultados sugieren que la regulación de la maquinaria de respuesta antiviral de la célula es diferente en la infección por el virus estacional *versus* el pandémico. Dado que la activación de la IRF-3 en la infección con la cepa pandémica inició a un tiempo tardío respecto a la infección con la cepa estacional, sugiere que el virus pandémico desde un tiempo muy temprano de la infección está conteniendo y retrasando la activación de la cascada de señalización del IFN-I y de esta forma se favorece la replicación del genoma viral y generación de progenie viral. Sabemos por resultados obtenidos en el laboratorio que la cepa pandémica de México 2009 tiene un ciclo de replicación viral más eficiente que la cepa estacional, ya que se generan del orden de 100 veces más partículas virales infecciosas. Nuestros resultados fueron semejantes a lo reportado por Kuo y colaboradores en el 2010, observaron que en células HEL-299 (de embrión humano) y MDCK infectadas con el subtipo H1N1 pandémico de California del 2009 (influenza A/California/09), la IRF-3 no se fosforilaba (9 hpi); además, los autores sugirieron que la inhibición de la IRF-3 fue modulada por la NS1, ya que observaron que la expresión del IFN ($\text{IFN-}\beta$) disminuyó. En contraste, en células infectadas con la cepa del subtipo H3N2 (A/Udorn/72 virus), se detectó a la IRF-3 activa (IRF3-P) y también se expresó el gen de *ifn*. Una de las diferencias entre estos dos subtipos de influenza está en la NS1 viral debido a las diferencias a nivel de secuencia de aminoácidos y conformacionales del dominio ED. La NS1 pandémica consta de 219 a. a. y tiene su carboxilo terminal más corto que la NS1 del subtipo H3N2 (237 a.a.). Estos resultados les sugirieron que la habilidad de la NS1 para bloquear la activación de IRF-3 difiere entre cada subtipo de Influenza e incluso del periodo de tiempo en el que apareció el subtipo, ya que solo las cepas del subtipo H1N1 que surgieron en la población después de 1990 conservan esta habilidad, y propusieron que



se debe a un cambio en un solo residuo en la posición 196 (E), sugiriendo que es un posible sitio de unión a otras proteínas (Kuo *et al.*, 2010). En base a esta propuesta, alineamos la secuencia de la NS1 de la cepa estacional y pandémica (Ver Anexo, Fig. A. 2.), y observamos que ambas tenían E en la posición 196, por lo tanto esperaríamos que ambas cepas tuvieran la capacidad de bloquear la activación de IRF-3 y del IFN.

Por otra parte, observamos que en la infección viral hubo una temporalidad en la activación de la IRF-3, lo que sugería que posiblemente estaba siendo modificada post traduccionalmente o inhibida por algún componente viral. Es por esta razón que decidimos evaluar si en la infección con los virus de Influenza (H1N1) la IRF-3 estaba siendo modificada por la adición de SUMO, siendo la proteína NS1 la encargada de modular este mecanismo como una estrategia para inhibir la respuesta antiviral. De manera interesante, observamos que en la infección con la cepa pandémica la IRF-3 era modificada por SUMO-1 en la fase temprana de la infección (12 hpi), sin embargo hacia las 16 y 24 hpi, la cantidad de IRF-3/SUMO-1 disminuye inclusive a niveles más bajos que los basales (mock). Sin embargo, observamos una correlación, en la infección con la cepa pandémica, la fosforilación de la IRF3-P se observó inicialmente desde las 16 hpi, a un tiempo en donde la SUMOilación disminuyó (Fig. 13). Estos resultados nos sugieren que hay un diálogo molecular entre la SUMOilación y fosforilación de la IRF-3 en la infección con Influenza pandémica; la SUMOilación podría ser el mecanismo que se está utilizando para bloquear la respuesta antiviral de la célula desde tiempos muy tempranos de la infección y así favorecer la generación de progenie viral (100 veces más de progenie viral comparado con la cepa estacional). En contraste con la cepa estacional, en donde los niveles de fosforilación y SUMOilación se mantuvieron constantes desde las 12hpi. Esta regulación temporal entre las dos modificaciones post-traduccionales podría estar siendo modulada por la proteína viral NS1, y de esta manera bloquear la respuesta del IFN-I. Se ha reportado, que para que la NS1 antagonice de manera eficiente la respuesta de IFN deber ser SUMOilada. Las lisinas (K70 y K219) sujetas de ser modificadas por SUMO se conservan en cepas que infectan a aves y a humanos, a excepción del virus pandémico (A/Sichuan/1/2009) que carece del sitio de unión a SUMO (K219) (Xu *et al.*, 2011). Se ha sugerido que estos residuos de K son claves en la patogénesis del virus ya que favorecen la interacción con diversos factores celulares (Santos *et al.*, 2013). En este proyecto



realizamos ensayos *in silico* para determinar los posibles sitios de SUMOilación de la NS1 de la cepa estacional y pandémica, estos análisis identificaron que ambas cepas (estacional/pandémica) conservan éstos sitios de unión a SUMO (Ver anexo, Fig. A. 2 y Fig. A. 3). En el caso de la IRF-3, se ha reportado que en humano se conservan dos sitios de unión a SUMO (K87/K152) (Ran *et al.*, 2011). En nuestro análisis nosotros encontramos cuatro posibles sitios de unión a SUMO de forma no covalente, uno de éstos es el sitio putativo K87 (Ver anexo A. 4 y A. 5).

Se ha reportado, que los virus de DNA y de RNA interaccionan con el sistema de SUMOilación celular para contender con la respuesta antiviral; y que es modulado por proteínas virales que favorecen la SUMOilación de los factores de transcripción como IRF3 para bloquear la activación del IFN (Kubota *et al.*, 2008; Ran *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2014). En el caso de Influenza, se sabe que la NS1 interacciona con el sistema de SUMOilación para llevar a cabo eficientemente su actividad como antagonista del IFN-I (Xu *et al.*, 2011) (Santos *et al.*, 2013). Además se sabe que la NS1 de algunas cepas inhibe la activación de IRF-3 (Kuo *et al.*, 2010) (Krug *et al.*, 2015). Aunque no se sabe si la NS1 tiene actividad de SUMO ligasa, el hecho de interaccione con componentes del sistema de SUMOilación (Xu *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013), y que en presencia de la NS1 se favorezca la SUMOilación de la IRF-3 (Fig. 14), podría ser uno de los mecanismos que explote la NS1 para regular negativamente la expresión del IFN.

VIII. CONCLUSIONES

1. En células infectadas con el virus de Influenza estacional, la proteína IRF-3 se relocalizó hacia el núcleo celular en donde colocalizó con SUMO-1.
2. En la infección con la cepa pandémica, la IRF-3 se localizó de manera difusa en el núcleo y citoplasma de la célula.
3. La proteína viral NS1 tanto estacional como pandémica, colocalizó con la SUMO-1 en el núcleo de la célula infectada.
4. La expresión de la IRF-3 total se mantuvo constante a lo largo del ciclo de replicación viral (estacional y pandémico).



5. La expresión de la proteína viral NS1 ocurre desde tiempos tempranos de infección y se mantiene hasta tiempos tardíos, tanto en el virus estacional como en el pandémico.
6. En la infección por el virus de Influenza estacional los niveles de IRF-3/SUMO-1 se incrementaron con respecto a células no infectadas. En contraste, en la infección con el virus pandémico la SUMOilación de la IRF-3 se incrementó a las 12 hpi, y hacia las 16 hpi el nivel de IRF-3/SUMO-1 disminuyó.
7. Los niveles de fosforilación de la IRF-3 en la infección con la cepa pandémica son menores comparado con la cepa estacional y además se observaron a un tiempo tardío del ciclo de replicación viral
8. La proteína viral NS1 favorece la SUMOilación de la IRF-3.

IX. PERSPECTIVAS

Realizar fraccionamientos celulares (núcleo y citoplasma) para cuantificar la cantidad de IRF-3/SUMO-1 durante la infección viral, y saber si existe relación con los niveles de expresión de IRF-3.

Cuantificar la expresión del gen de IFN mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real en células infectadas y/o transfectadas con un plásmido que codifica para la proteína viral NS1, para saber si existe una correlación entre los niveles de expresión del IFN y modificaciones post- traduccionales (Fosforilación y SUMOilación) de la IRF-3.



X. REFERENCIAS

1. Abdelwhab E. M., Veits J. & Mettenleiter T. C. 2013. Avian influenza virus NS1: A small protein with diverse and versatile functions. *Virulence*. 4 (7): 583-588. doi: 10.4161/viru.26360
2. Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* 35 (3): 235-241. PMID (PubMed-indexed for MEDLINE): 4329869
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2014. Variant (Swine Origin) Influenza Viruses in Humans. Consultado en Junio 2016. Disponible en: <http://www.cdc.gov/flu/swineflu/variant.htm>
4. Chang P. C. & Kung H. J. 2014. SUMO and KSHV Replication. *Cancers*. 6 (4): 1905-1924. doi: 10.3390/cancers6041905
5. Chang T. H., Kubota T., Matsuoka M., Jones S., Bradfute S. B., Bray M. & Ozato K. 2009. Ebola Zaire Virus Blocks Type I Interferon Production by Exploiting the Host SUMO Modification Machinery. *PLoS Pathog.* 5 (6): e1000493. doi: 10.1371/journal.ppat.1000493
6. Egli A., Santer D. M., O'Shea D., Tyrrell D. L., & Houghton M. 2014. The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. *Emerg. Microbes. Infect.* 3 (7). doi: 10.1038/emi.2014.51
7. Everett R. D. & Chelbi-Alix M. K. 2007. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie*. 89 (6-7): 819-830. doi: 10.1016/j.biochi.2007.01.004
8. Everett R. D., Boutell C. & Hale B. G. 2013. Interplay between viruses and host sumoylation pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (6): 400-411. doi: 10.1038/nrmicro3015.
9. Flint S. J., Enquist L. W., Racaniello V. R., & Skalka A. M. 2009. Principles of Virology 3rd ed. Vol. II *Pathogenesis and Control*. American Society for Microbiology Press. Washington D.C., USA. 318-319; 347-349 pp.
10. Medina R. A. & García-Sastre A. 2011. Influenza A viruses: new research developments. *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (8): 590-603. doi: 10.1038/nrmicro2613.



11. Geoffroy M. C. & Chelbi-Alix M. K. 2011. Role of promyelocytic leukemia protein in host antiviral defense. *J. Interferon Cytokine Res.* 31: 145-158. doi: 10.1089/jir.2010.0111.
12. Hale B. G., Randall R. E., Ortín J. & Jackson D. 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 89: 2359-2376. doi: 10.1099/vir.0.2008/004606-0
13. Han Q., Chang C., Li L., Klenk C., Cheng J., Chen Y., Xia N., Shu Y., Cheng Z., Gabriel G., Sun B. & Xu K. 2014. Sumoylation of Influenza A Virus Nucleoprotein Is Essential for Intracellular Trafficking and Virus Growth. *J. Virol.* 88 (16): 9379-9390. doi: 10.1128/JVI.00509-14
14. Honda K. & Taniguchi T. 2006. IRFs: master regulators of signaling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 6 (9): 644-658. doi: 10.1038/nri1900
15. Hsiang T. Y., Zhou L. & Krug R. M. 2012. Roles of the Phosphorylation of Specific Serines and Threonines in the NS1 Protein of Human Influenza A virus. *J. Virol.* 86 (19): 10370-10376. doi: 10.1128/JVI.00732-12
16. Killip, M. J., Smith M., Jackson D., & Randall, R.E. 2014. Activation of the interferon induction cascade by influenza a viruses requires viral RNA synthesis and nuclear export. *J. Virol.* 88(8): 3942–3952. doi: 10.1128/JVI.03109-13
17. Killip M. J., Fodor E. & Randall R. E. 2015. Influenza virus activation of the interferon system. *Virus. Res.* 209: 11-22. doi: 10.1016/j.virusres.2015.02.003
18. Knipe D. M. & Howley P. M. 2013. Fields Virology 6th ed. Vol. I. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 1151-1239 pp.
19. Krug R. M. 2015. Functions of the Influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Curr. Opin. Virol.*; 12: 1-6. doi: 10.1016/j.coviro.2015.01.007.
20. Kubota T., Matsuoka M., Chang T. H., Taylor P., Sasaki T., Tashiro M., Kato A. & Ozato K. 2008. Virus Infection Triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, Leading to the Negative Regulation of Type I Interferon Gene Expression. *J Biol Chem*; 283 (37): 25660-25670. doi: 10.1074/jbc.M804479200
21. Kuo R. L., Zhao C., Malur M. & Krug R. M. 2010. Influenza A virus strains that circulate in humans differ in the ability of their NS1 proteins to block the activation



-
- of IRF3 and interferon- β transcription. *Virology*. 408: 146-158. doi: 10.1016/j.virol.2010.09.012
22. Maarifi G., Maroui M. A., Dutrieux J., Dianoux L., Nisole S. & Chelbi-Alix M. K. 2015. Small Ubiquitin-like Modifier Alters IFN Response. *J. Immunol.* 195 (5): 2312-2324. doi: 10.4049/jimmunol.1500035
23. Maroui M. A., El Asmi F., Dutrieux J., Chelbi-Alix M. K. & Nisole S. 2014. Implication of PML nuclear bodies in intrinsic and innate immunity. *Med. Sci. Paris.* 30 (8-9): 765-771. doi: 10.1051/medsci/20143008014
24. Medina R. A. & García-Sastre A. 2011. Influenza A viruses: new research developments. *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (8): 590-603. doi: 10.1038/nrmicro2613.
25. Michaelis M., Doerr H. W. & Cinatl J. Jr. 2009. An influenza A H1N1 virus revival-pandemic H1N1/09 virus. *Infection.* 37 (5): 381-9. doi:10.1007/s15010-009-9181-5
26. Nelson M. I. & Vincent A. L. 2015. Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface. *Trends. Microbiol.* 23(3): 142–153. doi: 10.1016/j.tim.2014.12.002
27. Pal S., Rosas J. M. & Rosas-Acosta G. 2010. Identification of the non-structural influenza A viral protein NS1A as a bona fide target of the Small Ubiquitin-like Modifier by the use of dicistronic expression constructs. *J. Virol. Methods.* 163 (2): 498-504. doi: 10.1016/j.viromet.2009.11.010
28. Pal S., Santos A., Rosas J. M., Ortiz-Guzman J. & Rosas-Acosta G. 2011. Influenza A virus interacts extensively with the cellular SUMOylation system during infection. *Virus Res.* 158 (1-2): 12-27. doi: 10.1016/j.virusres.2011.02.017
29. Ran Y., Liu T. T., Zhou Q., Li S., Mao A. P., Li Y., Liu L. J., Cheng J. K. & Shu H. B. 2011. SENP2 negatively regulates cellular antiviral response by deSUMOylating IRF3 and conditioning it for ubiquitination and degradation. *J. Mol. Cell. Biol.* 3: 283-292. doi: 10.1093/jmcb/mjr020
30. Santos A., Chacón J. & Rosas-Acosta G. 2013. Influenza A Virus Multiplication and the Cellular SUMOylation System, Viral Replication, Dr. German Rosas-Acosta (Ed.), InTech, doi: 10.5772/54351. Consultado en Enero 2016. Disponible
-



-
- en: <http://www.intechopen.com/books/viral-replication/influenza-a-virus-multiplication-and-the-cellular-sumoylation-system>
31. Santos A., Pal S., Chacón J., Meraz K., Gonzalez J., Prieto K. & Rosas-Acosta G. 2013. SUMOylation Affects the Interferon Blocking Activity of the Influenza A Nonstructural Protein NS1 without Affecting Its Stability or Cellular Localization. *J Virol.* 87 (10): 5602-5620. doi: 10.1128/JVI02063-12
 32. Theofilopoulos A. N., Baccala R., Beutler B. & Knono D. H. 2005. Type I Interferons (α/β) in Immunity and Autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 307-36. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115843
 33. Trebbien R., Larsen L. E. & Viuff B. M. 2011. Distribution of sialic acid receptors and Influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Virol. J.* 8: 434. doi: 10.1186/1743-422X-8-434
 34. Wagner E. K., Hewlett M. J., Bloom D. C. & Camerini D. 2008. Basic Virology 3rd ed. Blackwell Publishing, USA. 283-288 p.
 35. Watanabe Y., Ibrahim M. S., Suzuki Y. & Ikuta K. 2012. The changing nature of avian influenza A virus (H5N1). *Trends. Microbiol.* 20: 11-20. doi:10.1016/j.tim.2011.10.003
 36. Wilkinson K. A. & Henley J. M. 2010. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J.* 428 (2): 133-145. doi: 10.1042/BJ20100158
 37. World Health Organization (WHO). 2010. World WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 and other Influenza Viruses. Consultado en Marzo 2016. Disponible en: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt.pdf?ua=1
 38. World Health Organization (WHO). 2014. Influenza (seasonal). Consultado en Marzo 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
 39. Wu C. Y., Jeng K. S. & Lai M. M. 2011. The SUMOylation of matrix protein M1 modulates the assembly and morphogenesis of influenza A virus. *J. Virol.* 85 (13): 6618-6628. doi: 10.1128/JVI.02401-10.
 40. Xu K., Klenk C., Liu B., Keiner B., Cheng J., Zheng B. J., Li L., Han Q., Wang C., Li T., Chen Z., Shu Y., Liu J., Klenk H. D. & Sun B. 2011. Modification of
-



-
- Nonstructural Protein 1 of Influenza A Virus by SUMO1. *J. Virol.* 85 (2): 1086-1098. doi: 10.1128/JVI.00877-10
41. Ysebrant de Lendonck L., Martinet V. & Gloriely S. 2014. Interferon regulatory factor 3 in adaptive immune responses. *Cell. Mol. Life. Sci.* 71 (20): 3873-3883. doi: 10.1007/s00018-014-1653-9
42. Zhao C., Hsiang T.Y., Kuo R.L. & Krug, R. M. 2009. ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107 (5):2253-8. doi: 10.1073/pnas.0909144107.



XI. ANEXO

Muestra (DNA)	NS1	SUMO-1	GFP
° 260/280	2.12	2.03	2.04
° 260/230	2.51	2.36	2.38
Concentración	239.3 (ng/μL)	403.6 (ng/μL)	343.1 (ng/μL)

A. 1. Grado de pureza del DNA de cada plásmido (pcDNA) SUMO-1, NS1 y GFP. En la tabla se muestra la pureza de cada muestra de acuerdo con la relación $260/280 \leq 1.8$. Los datos obtenidos son los siguientes: pcDNA NS1: 2.12; pcDNA de SUMO-1: 2.03; pcDNA GFP: 2.04. Para cada condición en base a su concentración obtenida (ng/μL) se hizo un ajuste a 6 μg de pcDNA. Esta cantidad fue la que se transfectó por condición.

AFO65032	1	MDPNTVSSSFQVDCFLWHVFRKRVADQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIKTATRAGKQIVERILKKEESDEALKMT	80
ADA72008	1	MDSNTMSSSFQVDCFLWHIRKRFADNGLGDAPFLDRLRRDQKSLKGRGNTLGLDIETATLVGKQIVIEWILKKEESSETLRMT	80
AFO65032	81	MASVPASRYLTDMTLEEMSRDWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAIMDKNIIILKANFSVIFDRLETLILLRAFTEEGAIVGEI	160
ADA72008	81	IASVPTSRYLSDMTLEEMSRDWFMLMPEKQKIIGPLCVRLDQAIMKNIIVLKANFSVIFNRLETLILLRAFTEEGAIVGEI	160
AFO65032	161	SFLPSLPGHTAEDVKNAVGVLIGGLEWNDNTVRVSETLQRFAMRSSNENGRPPLTPKQIREMAGTIRSEV	230
ADA72008	161	SFLPSLPGHTYEDVKNAVGVLIGGLEWNGNTVRVSENIQRFAMRNCDENGRPSLPEQK-----	219

A. 2. Alineamiento múltiple de la NS1 de la cepa estacional y pandémica. Utilizando la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>), se obtuvo la secuencia de la NS1 de la cepa estacional AFO65032.1 [Influenza A virus (A/New Caledonia/20/99 (H1N1))] y la cepa pandémica ADA72008.1 [Influenza A virus (A/swine/4/Mexico/2009 (H1N1))]. Posteriormente se llevó a cabo un alineamiento múltiple entre ambas secuencias utilizando el programa BLASTp de la base de datos NCBI. Asimismo, utilizando el programa de libre acceso SUMOsp. 2.0. (<http://sumosp.biocuckoo.org/>), se corroboraron los sitios de unión a SUMO parara cada NS1 (K70/K219). Este programa puede reconocer dos secuencias en una proteína: La secuencia Tipo I o secuencia consenso Ψ-K-X-E (marcada en amarillo), en donde Ψ es un aminoácido hidrofóbico, K es el sitio de conjugación a SUMO (en rojo), X es cualquier aminoácido y E/D un aminoácido de naturaleza acida. En este tipo de secuencias SUMO se une a la proteína de forma covalente. Por otro lado, también se identificó la secuencia Tipo II o no consenso (marcada en verde), son motivos de unión a SUMO de forma no covalente, por su acrónimo en inglés SIMs. Estos sitios están compuestos por un aminoácido hidrofóbico flanqueado por residuos de naturaleza ácida o Serinas fosforiladas.

Proteína	Posición	Secuencia	Tipo
NS1 Estacional (AFO65032.1)	70	RILKEES	Tipo I: Ψ-K-X-E
	219	PKQKREM	Tipo II: No consenso
NS1 Pandémica (ADA72008.1)	70	WILKEES	Tipo I: Ψ-K-X-E
	219	PEQK***	Tipo II: No consenso

A. 3. Tabla que ilustra los posibles sitios de SUMOilación de la proteína NS1 de la cepa estacional y pandémica. De acuerdo con los resultados del programa SUMOsp 2.0., en ambos casos se observó que la secuencia consenso Ψ-K-X-E (en donde Ψ es un aminoácido hidrofóbico, K es el sitio de conjugación a SUMO, X es cualquier aminoácido y E/D un aminoácido de naturaleza acida) o Tipo I corresponde al residuo de K en la posición 70, respectivamente. Por otra parte, la secuencia no consenso o Tipo II (motivos de unión a SUMO de forma no covalente (SIMs)) se ubicaron en el residuo de K219 en ambas NS1.



```

1  MGTPKPRILPWLVSQLDLGQLEGVAWVNKSRTRFRIPWKHGLRQDAQQEDFGIFQAWAEA
61  TGAYVPGRDKPDLPTWKRNFRSALNRKEGLRLLAEDRSKDPHDPHKIYEFVNSGVGDFSQP
121 DTSPDTNGGGSTSDTQEDILDELLGNMVLAPLPDPGPPSLAVAPEPCPQPLRSPSLDNPT
181 PFPNLGPPSENPLKRLLVPGEEWFEVTAFYRGRQVFQOTISCEPEGLRLVGSEVGDRTLPG
241 WPVTLDPDGMSLTDRGVMSYVRHVLSCLGGLALWRAGQWLWAQRLGHCHTYWAVSEELL
301 PNSGHGPDGEVPKDKEGGVFDLGPFIVGSWAPRSDYLHGRKRTLTTLCPVLVCGGVMAPG
361 PAVDQEARDGQGCAHVPQGLGRNGPGRGCLLPGEYCGPAHFQQPPTLPHLRPVQGLPAGL
421 GGGHGFPGPWGDLSPRSSWCASNPPVPHHLNQ
    
```

A. 4. Secuencia de la proteína IRF-3 en donde se señalan los posibles sitios de SUMOilación. Se obtuvo la secuencia de la proteína IRF-3 de humano obtenida de la base de datos NCBI (GenBank: AAH09395.1), y posteriormente se analizó el programa de libre acceso SUMOplot™ (<http://www.abgent.com/sumoplot>), para predecir los sitios de unión a SUMO. En ésta se encontraron cuatro residuos de lisina (K, marcada en rojo) correspondientes a motivos de baja afinidad por SUMO (sitios de unión a SUMO por la vía no canónica), subrayados en azul. Uno de estos sitios corresponde a un sitio putativo de unión a IRF-3 en humano (K87), marcado en verde, previamente reportado (Ran *et al.*, 2010).

Proteína	Posición	Secuencia	Tipo	Clasificación
IRF-3	39	RFRIPWKHGLRQDA	Tipo II: No consenso	■ Motivos con alta probabilidad
	70	YVPGRDK <u>PDLPTW</u> K	Tipo II: No consenso	
	87	RSALNR <u>KEGLRL</u> AE	Tipo II: No consenso	■ Motivos con baja probabilidad
	315	GEVPKD <u>KEGGVFDL</u>	Tipo II: No consenso	
				■ Motivos superpuestos

A. 5. Tabla donde se ilustran los sitios de unión a SUMO en la proteína IRF-3 humana. De acuerdo con el programa SUMOplot™, se encontraron cuatro posibles sitios de unión a SUMO (K39, K70, K87 y K315), aunque corresponde a motivos de baja afinidad a SUMO o secuencias no consenso (marcados en azul).