



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**DETERMINACIÓN DEL PAPEL DEL SISTEMA UBIQUITIN
PROTEASOMA EN EL CICLO DE REPLICACIÓN DE
ASTROVIRUS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. LUIS ALBERTO CASORLA PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Tomás David López Díaz

Instituto de Biotecnología-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Ramón González García Conde

Centro de Investigación en Dinámica Celular-UAEM

Dra. Susana Castro Obregón

Instituto de Fisiología-UNAM

Dr. Fernando Lledias Martínez

Instituto de Biotecnología-UNAM

Cuernavaca, Morelos. Febrero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y FISIOLÓGIA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, CAMPUS MORELOS, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. TOMÁS DAVID LÓPEZ DÍAZ, EN EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA DIRIGIDO POR LOS DOCTORES CARLOS F. ARIAS Y SUSANA LÓPEZ CHARRETON.

JURADO DE EXAMEN:

DRA. LAURA ALICIA PALOMARES AGUILERA

DRA. ROSARIO VERA ESTRELLA

DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA

DR. MARTIN GUSTAVO PEDRAZA ALVA

DR. FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA

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

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA (CONACyT).

DONATIVO IN-212211 Y IN-207714. DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DE PERSONAL.

PROGRAMA DE APOYO A LOS ESTUDIOS DEL POSGRADO Y A LA RED MEXICANA DE VIROLOGÍA POR LOS APOYOS RECIBIDOS PARA REALIZAR LOS DIVERSOS CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES.

Dedicatorias.

El presente trabajo lo dedico a mi familia por el apoyo brindado durante todos estos años y que me ha permitido llegar hasta aquí. Gracias por su apoyo y espero seguir contando con ustedes.

También le agradezco a Carlos Arias y Susana López así como a su grupo por todos los comentarios que me ayudaron a crecer y a generar un mejor proyecto. En particular a Tomás que como tutor se desempeñó excelentemente, gracias por tus consejos, paciencia y alentarme para ser un mejor investigador.

Le agradezco a mi comité tutorial que a lo largo del posgrado me hicieron muy acertadas observaciones y me ayudaron a desarrollar un mejor trabajo así como ser un mejor investigador.

De manera especial les quiero agradecer a los doctores Laura Palomares y Tonatiuh Ramírez y al grupo LAMMB por haberme dado la oportunidad de trabajar y aprender de ellos dentro de un ambiente muy cordial y enriquecedor.

Contenido

Resumen	6
Abreviaturas	8
1. Introducción	9
1.1 Generalidades	9
1.2 Genoma y poli proteínas.	10
1.3 Transcripción y Replicación.	14
1.4 Ciclo de Infección	16
1.5 Sistema: Ubiquitin-Proteasoma.	18
2. Antecedentes	21
3. Justificación.....	24
3.1 Hipótesis.....	24
3.1.1 Objetivo general.....	24
3.1.2 Objetivos particulares	24
3.2 Materiales y métodos	25
4. Resultados	30
4.1 Inhibidores del proteasoma reducen la progenie viral	30
4.2 El sistema UPS afecta tiempos tempranos de la replicación viral	32
4.3 La actividad del proteasoma se requiere para la expresión de las proteínas virales	34
4.4 Se requiere de la ubiquitinación para la eficiente replicación de astrovirus.....	35
4.5 El inhibidor del proteasoma MG132 no disminuye la poza de ubiquitina monomérica	40
4.6 El efecto de MG132 en la replicación viral no se debe a la inducción de autofagia o apoptosis	41
4.7 La inhibición del proteasoma reduce la abundancia de los RNA de polaridad positiva	43
4.8 La inhibición del proteasoma no afecta la primera ronda de traducción de las proteínas virales	45

5. Discusion.....	47
6. Conclusiones.....	52
7. Perspectivas.....	53
8. Referencias	54
Apéndice I.....	63
Artículo 1: The ubiquitin-proteasome system is necessary for the efficient replication of human astrovirus.	63
Apéndice II.....	81
Artículo 2: Most rotavirus strains require the cation-independent mannose-6-phosphate receptor, sortilin-1, and cathepsins to enter cells.....	81

Resumen

Las infecciones virales involucran interacciones entre la célula huésped y el virus. Estas interacciones han resultado en diferentes estrategias para interrumpir funciones específicas de la célula y manipularlas para beneficio de la replicación viral.

El sistema ubiquitin proteasoma (UPS) es una importante vía involucrada en diferentes procesos celulares como presentación de antígenos, regulación del ciclo celular, apoptosis, metabolismo, inflamación, regulación transcripcional y degradación de proteínas. Debido a la relevancia de este sistema, los virus han desarrollado diferentes estrategias para adaptarse a este sistema de acuerdo a sus necesidades y se ha reportado que esta interacción puede ocurrir en diferentes estadios de la infección. Asimismo, se ha demostrado que inhibir el UPS puede tener diferentes efectos sobre la replicación de diferentes virus de RNA y DNA, como inhibirla, retrasarla o potenciarla. Ya que su relevancia en Astrovirus no ha sido evaluada, en este trabajo proponemos un mecanismo por el que este sistema es relevante y que podría estar involucrado en la replicación de otros virus.

Astrovirus es una de las causas principales de gastroenteritis en infantes y animales a nivel mundial y, recientemente, se ha reportado que puede inducir encefalitis fatal en humanos inmunocomprometidos así como en animales. Para determinar si el UPS es relevante durante la infección, usamos diferentes inhibidores del proteasoma, los cuales resultaron en la reducción de la producción de progenie viral en más de un logaritmo. Para determinar en qué estadio es requerido este sistema, tratamos las células a diferentes tiempos de infección con MG132, y encontramos que se requiere posterior a la entrada durante las primeras 8 horas de infección. La inhibición del proteasoma resultó en la disminución de alrededor de un 80 % en la abundancia de las proteínas virales no estructurales y estructurales, lo cual podría explicar la reducción de la progenie viral. Como el sistema UPS es un sistema de dos componentes, decidimos evaluar la participación de la ubiquitina en la replicación viral, el cual es uno de los componentes. Para ello tratamos las células con Pyr41, un inhibidor de la enzima E1 requerida en el paso inicial del proceso de ubiquitinación. De manera similar a con MG132, hay una reducción en la producción de la progenie y las proteínas virales. Para corroborar los resultados, silenciamos la expresión de ubiquitina mediante RNA de interferencia y determinamos la producción de progenie y proteínas virales. Los resultados

muestran una reducción similar al tratamiento con Pyr41 y sugieren que la ubiquitina es necesaria para la replicación eficiente.

Para evaluar si la caída en la progenie y proteínas virales era debida a una reducción en la síntesis de los RNA virales, cuantificamos por PCR en tiempo real sus abundancias y encontramos una reducción en la cantidad del RNA genómico y subgenómico, pero no del antigenómico. Investigamos si los resultados anteriores obtenidos con el tratamiento del inhibidor del proteasoma MG132 eran debidos a una reducción de ubiquitina en la célula y encontramos que los niveles de ubiquitina no son reducidos, lo cual sugiere que el componente necesario para una replicación eficiente es la actividad proteolítica del proteasoma. Además determinamos que el efecto de MG132 es específico sobre el proteasoma ya que no induce autofagia o apoptosis que pudieran estar interfiriendo con la replicación viral.

Por otro lado, investigamos si la reducción en la síntesis de los RNA virales en presencia de MG132 era debida a la inhibición de la primer ronda de traducción del RNA viral. La cual da origen a las proteínas no estructurales, como la polimerasa viral. Encontramos que la síntesis de la proteasa viral a las 4 h post infección no se ve reducida y sugiere que la primer ronda de traducción viral no se ve afectada.

Los hallazgos en este estudio muestran por primera vez una fina regulación del proteasoma para la acumulación específica de los RNA de polaridad positiva y establece un posible mecanismo requerido durante la replicación de otros virus.

Abreviaturas

agRNA.....RNA antigenómico
CP.....Core proteolítico
DUB.....Enzima des ubiquitinizantes
gRNA.....RNA genómico
HAstV.....Astrovirus humanos
ICTV.....Comité Internacional en Taxonomía de Virus
MOI.....Multiplicidad de infección
NLS.....Secuencia de localización nuclear
RdRp.....RNA polimerasa dependiente de RNA
RE.....Retículo endoplásmico
RNAi.....RNA de interferencia
SEM..... Error estándar de la media
sgRNA.....RNA subgenómico
UFF.....Unidades formadoras de focos
UPS.....Sistema ubiquitin proteasoma
UTR.....Región no traducida

1. Introducción

1.1 Generalidades

Las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En México, los estudios realizados hasta el 2014 muestran que dichas enfermedades son la segunda causa de mortalidad en niños de edad preescolar [1]. Distintos estudios epidemiológicos indican que los astrovirus son una de las principales causas de gastroenteritis viral en niños a nivel mundial y se ha demostrado su extrema seroprevalencia, ya que el 90% de la población mundial presenta anticuerpos contra astrovirus [2-7]. Recientemente se ha reportado que estos virus inducen encefalopatías fatales en pacientes inmunocomprometidos [8, 9]. Se ha reportado su papel en encefalopatías en ganados porcinos y ovinos. Actualmente en ganados vacunos de Suecia induce el 25% de las encefalopatías. Su presencia en este tipo de afecciones data de muestras provenientes de 1958, lo cual indica su relevancia desde hace décadas [10-15]. Los astrovirus pueden ser transmitido a través de la ruta fecal-oral y la infección ocurre en el intestino delgado [16]. En estudios realizados en humanos voluntarios se ha observado que el periodo de incubación es de 3 a 4 días. La sintomatología típica de la infección es diarrea moderada que puede estar acompañada de vómito y dolor abdominal. Esta enfermedad tiene una duración promedio de 6 días [17].

La familia Astroviridae fue constituida en 1995 por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (siglas en inglés ICTV) e incluye tanto astrovirus humanos como de otros animales. Son virus no envueltos, icosaédricos, con forma de estrella de 5 o 6 puntas al observarse por microscopía electrónica [3]. Su tamaño es de alrededor de 40 nm de diámetro y su cápside está conformada por un solo tipo de proteína que envuelve un genoma de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva [18].

Se han definido dos géneros dentro de la familia astroviridae basado en el origen del virus y la estructura del genoma.: aquellos que pueden tomar como huésped diferentes especies de mamíferos (género Mamastrovirus) y aquellos que pueden infectar aves (género Avastrovirus). Inicialmente la clasificación dentro de cada género se basaba en la especie huésped que infectaban, sin embargo, actualmente cada género está dividido en genotipos o

especies virales que toma en cuenta el rango de huéspedes que infectan así como las diferencias en la secuencia de la cápside. El Comité Internacional en Taxonomía de Virus reconoce 19 especies virales dentro del género mamastrovirus y 3 especies dentro del género avastrovirus, sin embargo, se ha reportado que este número continúa creciendo, reportándose hasta 33 especies para el género mamastrovirus y 11 especies para avastrovirus [4]. Dentro de los que infectan a mamíferos encontramos cepas que pueden infectar humanos (HAstV), bovinos (BAstV), cerdos (PoAstV), hurones (MAstV), gatos (FAstV), ratones, ratas, venados, chitas (ChAstV) y murciélagos; mientras que los que infectan aves, encontramos cepas provenientes de pollos (CAstV) y pavos (TAstV) [3].

Con base en la reactividad del virus con anticuerpos policlonales, los HAstV se han clasificado en 8 serotipos (HAstV 1-8), dicho grupo se conoce como astrovirus clásicos [7, 19]. El agrupamiento filogenético de HAstV basado en el análisis de secuencias de nucleótidos del ORF 2 muestra que hay correlación entre genotipo y serotipo [20]. De manera general, HAstV 1 es el serotipo más común en muestras obtenidas de niños enfermos, sin embargo, esto puede variar de acuerdo a la región geográfica [21, 22].

Recientemente se han descrito dos nuevos grupos de astrovirus que pueden infectar humanos denominados HAstV-MLB y HAstV-VA/HMO. El primer grupo fue descubierto en 2008 en muestras pediátricas provenientes de Melbourne, Australia, cuya presencia se ha detectado en diferentes lugares del mundo [23-25]. El segundo grupo (HAstV-VA/HMO) se descubrió en el año 2009 y provenía de muestras de infantes con diarrea del estado de Virginia (VA) (las siglas HMO vienen del inglés human, mink, and ovine-like), de igual forma se ha observado su presencia en diferentes partes del mundo como Nigeria, Pakistan y Nepal [26, 27].

1.2 Genoma y poli proteínas.

HAstV tiene un genoma de 6.8 Kb y durante la infección se han detectado dos especies de RNA de polaridad positiva: RNA genómico (gRNA) y subgenómico (sgRNA) de 2.4 Kb, el cual es colinear con el extremo 3' del genoma. El RNA extraído de las partículas virales (RNA genómico) y transfectado en células es capaz de generar progenie viral [28]. El genoma viral consta de un extremo 5' y 3', una cola de poli A en el extremo 3', una proteína VPg

unida a su extremo 5' y tres marcos de lectura abiertos (ORF). Dos de esos ORFs se encuentran en el extremo 5' del genoma y se denominan ORF-1a y ORF-1b, estos ORFs codifican para proteínas no estructurales. El tercer ORF denominado ORF 2, se encuentra en el extremo 3' y codifica para una proteína estructural [29]. También se ha descrito un ORF putativo alternativo llamado ORF X, el cual sobrelapa con el ORF 2. Este nuevo ORF de entre 91-122 codones se encuentra conservado en todos los HAsV, hasta el momento no se sabe si se traduce una proteína a partir de este ORF o si pudiera ser funcional (**Figura 1**)[30].

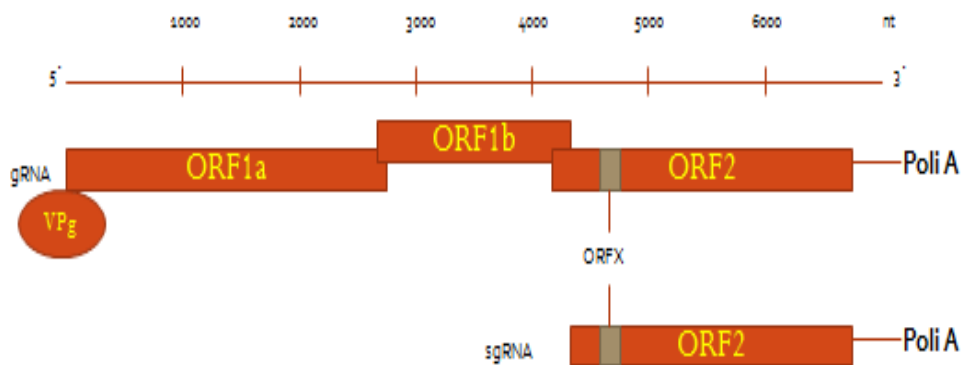


Figura 1. Organización del genoma de astrovirus. En la imagen se representan las regiones no traducidas 5' y 3', una cola de poli A en el extremo 3', los tres ORF; dentro del ORF2 se encuentra un ORF hipotético denominado ORFX; el extremo 5' se encuentra unido a una proteína nombrada VPg, la cual interviene en la replicación viral [31]. En la parte inferior se muestra el RNA subgenómico (sgRNA).

Las proteínas no estructurales de astrovirus se traducen como dos poli proteínas, nsP1a (101 kDa) y nsP1ab (160 kDa) (**Figura 2**). La traducción del ORF1a se detiene en un codón de terminación ámber para producir a nsP1a, mientras que nsP1ab se produce a través de la fusión traduccional del ORF1a y ORF1b, resultado de un cambio de fase [32]. El procesamiento de la poli proteína viral no está completamente caracterizado ya que se han reportado diferentes intermediarios y productos finales dependiendo de la cepa viral y del sistema de expresión en estudio [33-35]. Sin embargo, se sabe que el procesamiento de la poli proteína no estructural viral nsP1ab (160 kDa) da origen a la polimerasa de 57 kDa y a la poli proteína nsP1a de 102 kDa. nsP1a, es una proteína de 920-935 aminoácidos de longitud, la cual se compone de 5 a 6 helices transmembranales que se sugiere pudieran estar involucrados en el direccionamiento y anclaje de los componentes de los centros de

replicación en estructuras membranosas; seguidos de un motivo proteasas de serina que tiene características similares a quimiotripsin-proteasas de otros virus de RNA de polaridad positiva (**Figura 2**) [36]. Rio abajo de la proteasa viral, se ha encontrado una secuencia de localización nuclear (NLS) en las cepas de HAstV, sin embargo, no está claro si participa durante la infección [36]. Por otro lado, se ha caracterizado la proteína VPg, la cual se encuentra rio arriba del motivo de proteasa viral [37]. Al extraer RNA viral de células infectadas con astrovirus y tratarlas con RNAsa, se observa una proteína de alrededor de 15 kDa, lo cual concuerda con el peso predicho de la proteína y sugiere que está asociada a dicho RNA, asimismo al secuenciar esta proteína por espectrometría de masas se confirmó que era una proteína VPg. Por otro lado, el tratamiento con proteasas de este RNA viral, resulta en la pérdida de infectividad cuando se transfecta a células sin infectar [31].

Lo que es claro de estos análisis es que las poli proteínas virales se procesan por la proteasa de serina viral para producir las proteínas no estructurales individuales, aunque también se ha visto que las proteasas celulares pueden participar en al menos un evento de corte [34, 35]. El número y tamaño final de las proteínas no estructurales no se conocen en su totalidad, sin embargo, se cree que se pueden generar al menos 5 proteínas no estructurales: 1) una proteína de 20 kDa que contiene un domino transmembranal y un dominio coiled-coil (nsP1a-1); 2) una proteína predicha que contiene 4 dominios transmembranales (nsP1a-2); 3) una proteasa de serina de 27 kDa (nsP1a-3); 4) la región nsP1a-4 que contiene la proteína VPg; y 5) una RNA polimerasa dependiente de RNA de 57 kDa (515-528 aminoácidos) (nsP1b) (**Figura 2**) [33, 35, 38].

Aunque no se sabe si el procesamiento de la poli proteína viral ocurre antes o durante la formación de los centros de replicación, se sugiere que la poli proteína viral nsP1a se dirige a retículo endoplásmico (RE) ya que contiene una secuencia de localización a RE al final de su terminal carboxilo. De igual forma, se ha observado la co-localización de la polimerasa viral con RE por microscopía electrónica, lo cual sugiere que los centros de replicación se forman a partir de membranas de retículo endoplásmico (RE). Asimismo, durante la infección ocurren re-arreglos de la membrana tanto *in vitro* como *in vivo* [39-41].

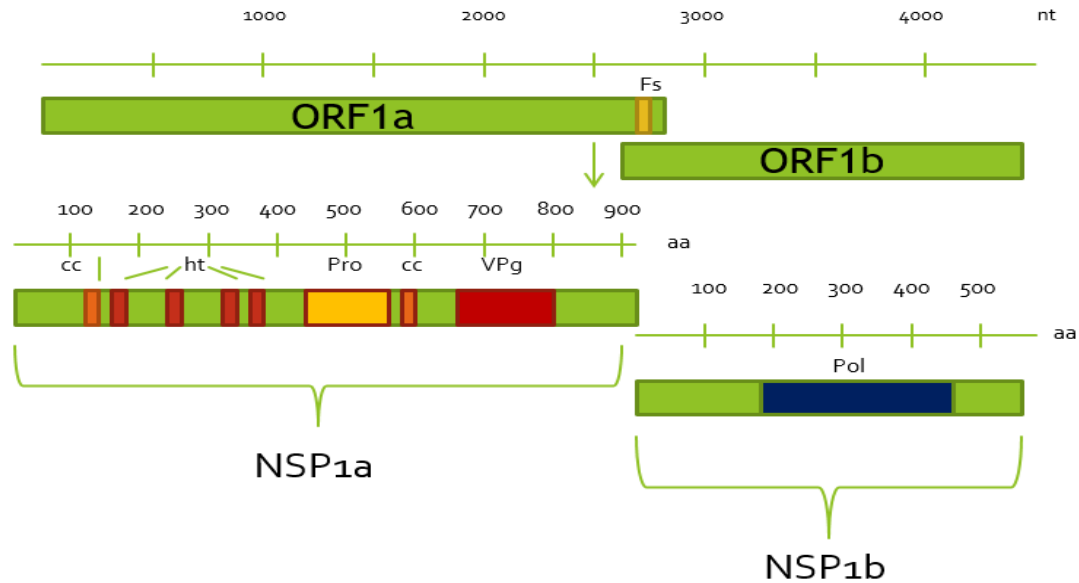


Figura 2. Proteínas no estructurales. En la figura se muestra la proteína no estructural NSP1a y NSP1b codificadas en el ORF1a y ORF1b, respectivamente. En la NSP1a se observan regiones de hélices transmembranales (ht), dominios colied-coil (cc), la proteasa viral (Pro), el cambio de marco de lectura (fs) y la proteína de unión a RNA viral VPg. En NSP1b se muestra la polimerasa viral (Pol).

El ORF 2 es la secuencia más variable dentro del genoma de astrovirus y codifica para la proteína de cápside. En HAstV, el RNA subgenómico (sgRNA) que proviene del ORF2 da lugar a una proteína de una longitud de entre 782-796 aminoácidos llamada VP90 (90 kDa) y el mecanismo de traducción del sgRNA se cree que es mediado por la VPg en su extremo 5', como ocurre en calicivirus [31, 42].

Se ha observado un alto grado de conservación de 415 aminoácidos hacia la región amino terminal en cepas humanas, así como dos pequeñas regiones hipervariables dentro de esta región [43]. Debido al carácter básico del amino terminal de la proteína, se piensa que está involucrado en el reconocimiento del RNA viral durante el ensamblaje [44]. Rio abajo de la región conservada del amino terminal hacia el carboxilo, se encuentra una región considerablemente variable que presenta inserciones o deleciones [43]. La región hipervariable del extremo carboxilo terminal está involucrada en la formación de las espículas virales y en las interacciones tempranas del virus con algún receptor celular [45-47]. En el extremo carboxilo terminal de la proteína de cápside también se encuentra una región de carácter ácido (649-702 en HAstV 8) que esta conservada tanto en los

mamastrovirus como avastrovirus. Se ha observado que esta región es importante para el procesamiento intracelular de la proteína VP90 hacia VP70 en el serotipo HAstV-8 y se sugiere que este procesamiento podría ocurrir para los demás serotipos. Dicho procesamiento está asociado a la liberación de la célula por un mecanismo no lítico [18, 48].

Se ha sugerido que la síntesis de las proteínas de cápside ocurre en regiones asociadas a los centros de replicación, ya que por microscopía electrónica se han observado agregados de partículas virales rodeados por vesículas de doble membrana alrededor del núcleo [39, 41]. Una vez que se liberan las partículas de estas vesículas, son procesadas por caspasas como se mencionó anteriormente y la partícula resultante que se libera al medio extracelular (VP70) es procesada por la tripsina que se encuentra en el intestino para un nuevo ciclo de infección (Figura 3 y 4).

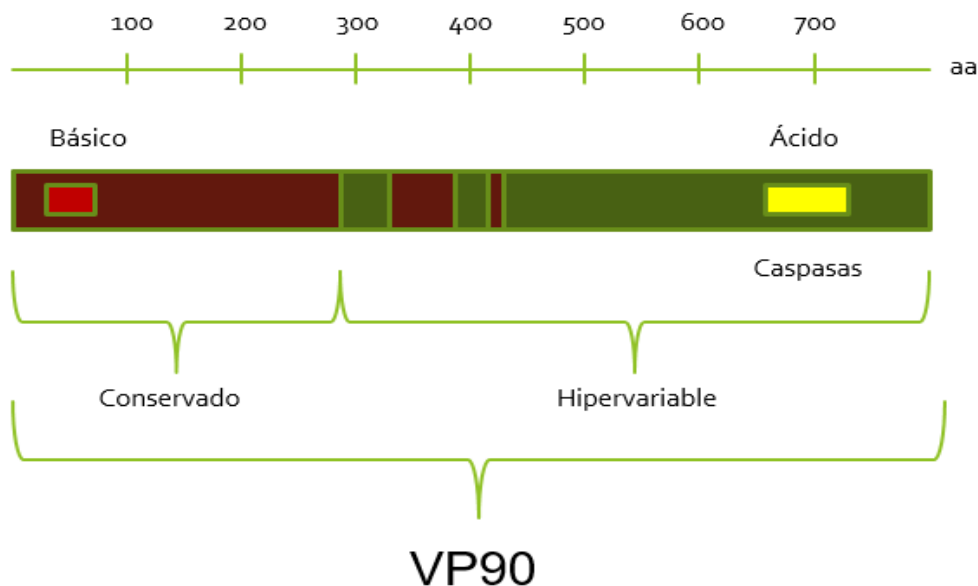


Figura 3. Proteína estructural. En la figura se muestra la única proteína estructural de astrovirus llamada VP90. Se observan dos regiones, la conservada de color gris y la hipervariable en café. De igual forma se muestra las regiones de carácter básico y ácido, que es reconocida por caspasas.

1.3 Transcripción y Replicación.

Se sabe poco sobre los eventos de replicación de astrovirus, sin embargo, lo que se conoce es consistente con los mecanismos empleados por otros virus de RNA de polaridad positiva. Se piensa que después de la traducción del gRNA y el procesamiento de las poli proteínas no

estructurales, se forma un complejo de replicación viral que usa el gRNA para formar un RNA de polaridad negativa, el cual se observa desde las 6-12 horas pos infección [49]. Se ha observado que el complejo de replicación viral en otros virus de RNA de polaridad positiva contiene a la RNA polimerasa dependiente de RNA viral, proteínas no estructurales y proteínas celulares necesarias. En el caso de astrovirus, se ha observado que se necesita a la proteína nsp1a/4 (que corresponde al extremo C-terminal de nsp1a) y a la polimerasa viral para la replicación [50]. Recientemente, se han realizado análisis de las proteínas que interactúan con la polimerasa viral por espectrometría de masas y se encontró que interaccionaba principalmente con proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos. Ensayos de interferencia contra proteínas involucradas en la síntesis de ácidos grasos, colesterol y helicasas de RNA resultaron en la disminución de los RNA virales y la progenie viral [51]. Además, se ha demostrado la unión de dos complejos de proteínas celulares que reconocen la región 3' no traducida (3'UTR) en HAstV-8. Una de estas proteínas es PTB/hnRNP1, la cual reconoce la primera estructura de hélice dentro del 3'UTR y un motivo de unión a PTB/hnRNP1 que está conservado en todos los astrovirus humanos. La reducción de los niveles de esta proteína, por medio de ensayos de interferencia, resultan en la reducción de la polimerasa viral en 80% de su abundancia y una reducción de 90% en la síntesis del RNA antigenómico [52]. La transcripción del gRNA y sgRNA a partir del RNA de polaridad negativa se observa desde las 8 horas post infección, aunque se desconoce del mecanismo que provoca que el complejo replicasa viral cambie de sintetizar RNA de polaridad negativa a sintetizar RNA de polaridad positiva y sgRNA (**Figura 4**) [28].

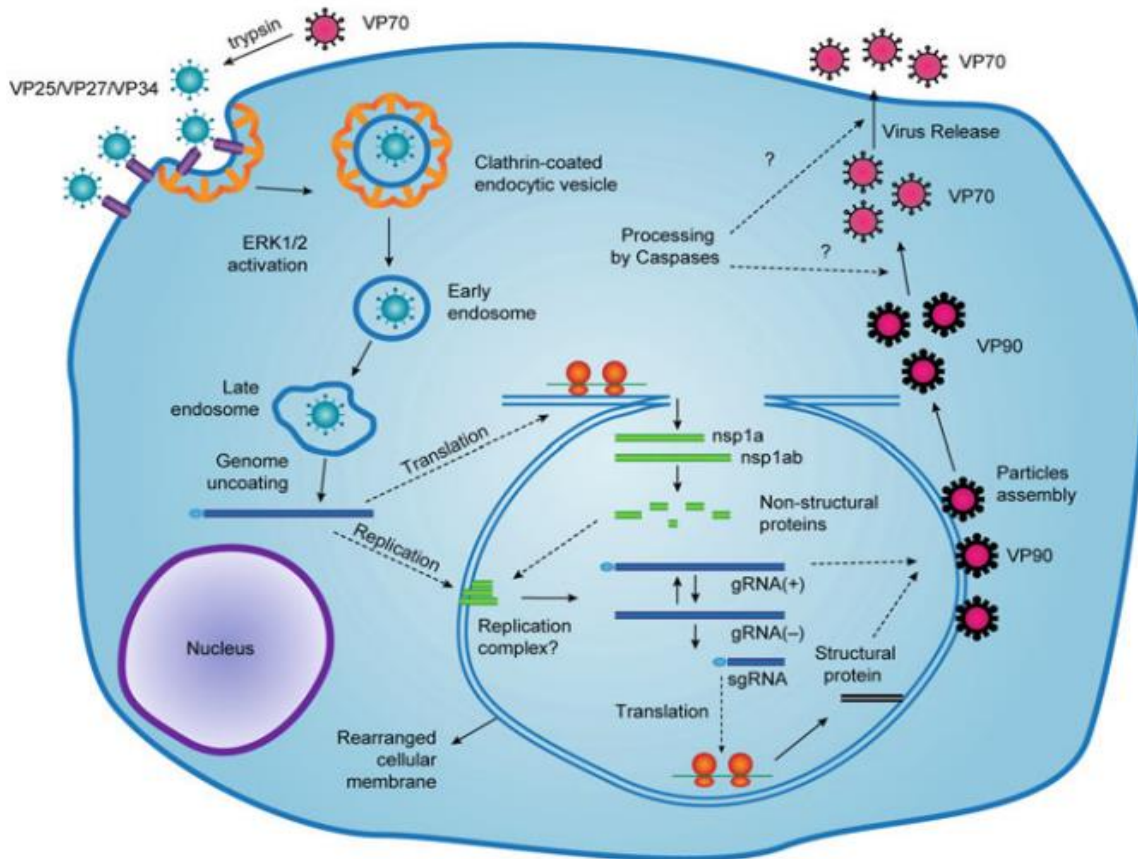


Figura 4. Ciclo de replicación. En la figura se muestra el ciclo de replicación de astrovirus desde la entrada hasta la salida de la célula de la progenie infecciosa (como se describe en el texto). Tomado de Méndez, E. 2012. *Astrovirus Research*.

1.4 Ciclo de Infección

Las interacciones tempranas de astrovirus con su huésped no han sido bien caracterizadas y se desconoce cuál es el receptor celular. Sin embargo, se sabe que diferentes serotipos de HastV tienen diferentes tropismos *in vitro*, lo cual sugiere que probablemente diferentes cepas usen diferentes receptores [53].

Se sabe que las partículas que entran al sistema digestivo son procesadas por la tripsina del intestino como parte del inicio del ciclo de infección e incluso se ha demostrado que el tratamiento de astrovirus con tripsina mejora la infectividad de 3-5 logaritmos [54, 55]. En HastV-8, el corte por tripsina genera tres productos VP34, VP25 y VP27 [55], lo cual resulta

en un drástico cambio estructural de la partícula [54]. VP34 representa el dominio conservado y forma el “core” de la capsida, mientras VP25 y VP27 forman las espículas de superficie. Se ha observado que anticuerpos dirigidos contra VP25 y VP27 resultan en la inhibición de la infectividad, probablemente debido a que bloquean la unión viral con el receptor celular [56].

Se ha reportado que la partícula viral es capaz de unirse a la célula tras 9 minutos de incubación. La entrada es mediada por endocitosis dependiente de clatrina, ya que se han observado partículas virales en vesículas y drogas que inhiben la endocitosis-dependiente de clatrina inhiben la infección viral. Además, se ha observado que se requiere pH ácido en los endosomas para la infección [57]. Hasta ahora, el mecanismo por el cual se libera el genoma, el sitio donde se libera y los factores involucrados se desconocen. Sin embargo, se sabe que en células epiteliales como Caco-2, HstV-8 se desnuda a los 130 min de su entrada y que requiere llegar a endosomas tardíos para una infección productiva, ya que al interferir Rab7, la infectividad se reduce [58] (**Figura 4**).

Después del desnudamiento de la partícula, el RNA viral se traduce en proteínas no estructurales y se cree que esto podría ser mediado por la proteína VPg, la cual podría reclutar a la proteína de unión a cap eIF4E para iniciar la traducción [31, 37]. En calicivirus, se ha demostrado la interacción de la VPg con eIF4E y eIF3 para promover la formación del complejo de pre-inicio de la traducción [59]. A partir de estas proteínas no estructurales se crea un complejo de replicación que se forma en estructuras membranosas provenientes de RE. La polimerasa reconoce el RNA viral de la partícula inicial para sintetizar el templado de cadena negativa (RNA anti genómico), este templado se utiliza para generar las cadenas positivas del RNA viral; el RNA genómico y el RNA sub genómico [39]. A partir del RNA sub genómico se sintetiza la proteína estructural que se ensambla junto con el RNA genómico para generar partículas virales (VP90), las cuáles son procesadas posteriormente por caspasas (hacia VP70). Este proceso se sabe que es necesario para la liberación del virus hacia el medio extracelular. Las partículas liberadas son posteriormente procesadas por tripsina, generando una partícula infecciosa para el siguiente ciclo de infección [18, 41].

1.5 Sistema: Ubiquitin-Proteasoma.

En células eucariotas el sistema ubiquitin-proteasoma (UPS) controla casi todos los procesos celulares básicos como avance del ciclo celular, transducción de señales, muerte celular, respuesta inmune, metabolismo, control de calidad de proteínas y desarrollo celular. Esto porque constituye el principal sistema de degradación de proteínas aberrantes o regulatorias de vida corta [60].

El proteasoma es un complejo con actividad proteasa con un coeficiente de sedimentación 20S. Dos tipos de unidades regulatorias, PA700 o PA28 (también denominadas 19S), se unen a los extremos del proteasoma para formar el proteasoma 26S, el cual está compuesto de 33 subunidades diferentes [61]. El proteasoma o “core” proteolítico (CP) es una estructura en forma de barril de ~730 kDa que consiste de cuatro anillos heptaméricos, mientras que la unidad regulatoria P es un complejo de ~930 kDa constituida de 19 diferentes subunidades. La unidad regulatoria 19S se une a uno o ambos extremos de CP para formar un proteasoma enzimáticamente activo [62]. Otros activadores del proteasoma son proteínas capaces de unirse al proteasoma y estimular la hidrólisis como PA200 [63]. Se han descrito diferentes tipos de proteasomas entre los que se encuentran los proteasomas híbridos que se forman a partir de un proteasoma 20S unido en un extremo a una unidad regulatoria 19S y en el otro extremo a un activador.

Otro tipo de proteasomas son los inmunoproteasomas, los cuales se forman cuando las subunidades catalíticas de los proteasomas constitutivos son reemplazadas por subunidades inducibles por interferón [64]. El interferón γ es una citocina que incrementa la expresión de diversos componentes celulares involucrados en la presentación de antígenos de clase I. Entre los componentes del proteasoma inducibles por interferón se encuentran tres subunidades catalíticamente activas llamadas LMP2, LMP7 y MECL1 [65], las cuáles reemplazan a sus correspondientes subunidades constitutivas, alterando la preferencia de corte de enlaces peptídicos del inmuno proteasoma 20S. Se ha observado que el inmuno proteasoma presenta una menor tasa de corte después de residuos ácidos y una mayor preferencia de corte de residuos ramificados como isoleucina. Los complejos de MHC de clase I unen preferencialmente péptidos con residuos hidrofóbicos o positivos y los proteasomas generan los péptidos para los complejos de MHC I. Por lo tanto, los cambios de subunidades β

resultan en la generación de los péptidos que se unen al MHC I [64, 65]. Tales inmuno proteasomas se encuentran principalmente en tejidos inmunes, donde juegan un papel en la presentación de antígenos de clase I [66].

El proteasoma está compuesto por dos tipos de subunidades llamadas α y β , cada subunidad forma anillos heptaméricos que se ensamblan para formar el proteasoma 20S. Los anillos α , los cuales son catalíticamente inactivos forman, el extremo del barril mientras los anillos proteolíticos β forman el par de anillos centrales. Es en estos anillos donde reside la actividad proteolítica tipo tripsina, quimiotripsina y caspasa [62]. El mecanismo catalítico que emplea el proteasoma se basa en residuos de treonina amino terminal de las subunidades β , las cuáles actúan como nucleófilos durante la hidrólisis del enlace peptídico [67].

El complejo regulador (RC) se divide en dos complejos, uno llamado tapa o “lid” y el otro llamado base. La base contiene 9 subunidades, entre las cuales se encuentran 6 ATPasas, las dos subunidades más grandes del complejo regulador, S1 y S2; así como la S5a. Estas subunidades tienen la capacidad de unir cadenas de poli ubiquitinas o dominios tipo ubiquitina [68, 69]. La tapa contiene las demás subunidades del RC [61]. Las 6 ATPasas que contiene la región reguladora pertenecen a la familia de las AAA ATPasas. Estas ATPasas conocidas como S4, S6, S6', S7, S8 y S10b; y tienen una longitud de 400 aminoácidos [62, 64].

Dentro de las subunidades que no son ATPasas podemos encontrar 8 en el subcomplejo de la tapa. De estas, la subunidad S13 tiene actividad metaloisopeptidasa que remueve las cadenas de ubiquitina del sustrato antes de su translocación en el proteasoma para su degradación [70].

La síntesis de las subunidades del proteasoma está regulada por la actividad del proteasoma. Se ha reportado que en levadura, la síntesis de estas subunidades está regulada por un factor de transcripción llamado Rpn4p, el cual se une a elementos PACE río arriba de los genes del proteasoma [71]. Rpn4p es un sustrato del proteasoma 26S, funcionando como un control de retroalimentación negativa, en el cual el proteasoma regula la cantidad de este factor de transcripción y de esta forma también regula sus propios niveles [72].

La ubiquitina (Ub) es una proteína de 76 residuos de longitud (con siete residuos de lisina), que se une de manera específica a un residuo de lisina de su proteína blanco para posteriormente generar una cadena de poli ubiquitina. Dependiendo del residuo de lisina de la ubiquitina donde se genere la cadena de poli Ub, puede marcarla para su degradación por el proteosoma 26S. El proceso de ubiquitinación involucra la acción concertada de tres reacciones enzimáticas. Primero, la ubiquitina se activa de manera dependiente de ATP por una enzima activadora de ubiquitina (E1) la cual forma un enlace tiol ester entre un residuo de glicina de la Ub y una cisteína de la E1. Después, la Ub activada es transferida a una enzima conjugadora (E2) a través de otro enlace tiol ester. Finalmente, una ligasa (E3) transfiere la ubiquitina a la proteína blanco mediante la formación de un enlace amida con el grupo ϵ amino de un residuo de lisina. Después de repetidas rondas de ubiquitinación se generan múltiples moléculas de Ub en la proteína blanco. Las cadenas de poli Ub con 4 o más Ub generadas en la lisina 48 de la ubiquitina inicial son enviadas al proteosoma 26S para la degradación de la proteína blanco en oligopéptidos. Posteriormente, las cadenas de poli Ub son desensambladas por enzimas des ubiquitinizantes (DUB), las cuáles cortan las Ub de la cadena para su reciclamiento (**Figura 5**) [73].

Además de su papel en la degradación de las proteínas, la ubiquitinación está involucrada en eventos de señalización tales como endocitosis, tráfico vesicular, activación de la respuesta inmune, y liberación de partículas virales. La ubiquitinación puede dividirse en: mono ubiquitinación que consiste en la adición de una sola molécula de Ub a la proteína blanco; multi ubiquitinación que consiste en la adición de múltiples moléculas de Ub en diferentes regiones de la proteína blanco sin generar una cadena de poli Ub; o poli ubiquitinación, dentro de la poli Ub se puede encontrar ramificada o lineal. Se ha reportado que la mono ubiquitinación y multi ubiquitinación están asociadas a eventos de reparación de DNA, endocitosis, expresión génica y salida viral. La ubiquitina tiene siete residuos de lisina y dependiendo en qué residuo crezca la cadena de poli Ub, puede estar asociada a degradación o señalización. Si la cadena de poli Ub se crea en la lisina 48 u 11, la proteína blanco se dirige a degradación; mientras que si ocurre en la lisina 63 se relaciona a eventos de tolerancia en daño a DNA, transducción de señales, endocitosis y activación de cinasas [74, 75].

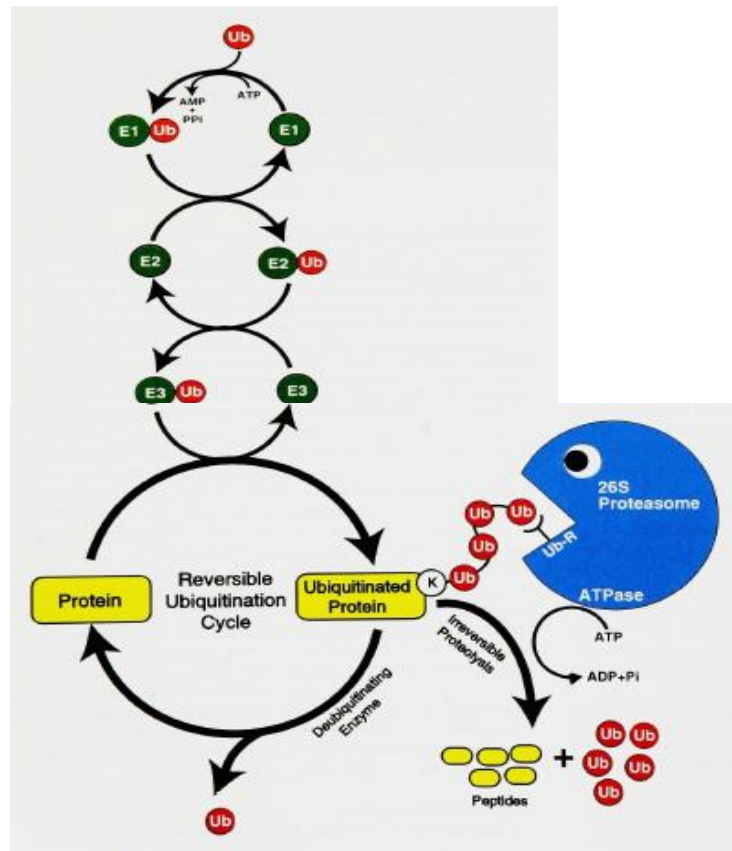


Figura 5. Degradación de proteínas ubiquitinadas. En la figura se muestra la adición secuencial de proteínas de ubiquitina a la proteína blanco mediada por la acción concertada de E1, E2 y E3. Posteriormente, la proteína blanco es reconocida por el proteasoma, cortada en péptidos y las moléculas de ubiquitina son recicladas. Tomado de **Tanaka, K. 1998. *Proteasomes: structure and biology.***

2. Antecedentes

Los virus de RNA de polaridad positiva cubren más de un tercio de todos los géneros de virus e infectan desde plantas hasta humanos. Algunos ejemplos de esta clase de virus son cosackievirus, poliovirus, HCV (virus de la hepatitis C), EMCV (virus de la encefalomiocarditis), HAV (virus de la hepatitis A), SARS-CoV (coronavirus del síndrome respiratorio agudo), virus del Oeste del Nilo y dengue [76].

De manera similar que otros virus, los virus de RNA de polaridad positiva toman el control de la maquinaria del huésped para su beneficio. En particular, el sistema ubiquitin proteasoma

(UPS) que es una de las vías que se ha estudiado ya que se ha observado que la interacción de esta clase de virus con el UPS es importante en muchos aspectos del ciclo de viral.

En el caso de los virus de RNA de polaridad positiva, se ha observado que una adecuada estequiometría de las proteínas virales es esencial para una replicación efectiva y esta regulación es mediada por el sistema ubiquitin-proteasoma [77-79]. Se ha reportado que el exceso de proteína no estructural viral es desventajosa para la replicación de ciertos virus [79]. Para contrarrestar este efecto, algunos virus de RNA de polaridad positiva emplean la maquinaria del huésped, como el UPS, para degradar el exceso de proteínas virales y evitar que interfieran con su replicación. Se ha observado que una adecuada estequiometría de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) es un factor clave, ya que puede afectar rearrreglos en la membrana, replicación y recombinación de RNA [80, 81]. Por ejemplo, la sobre expresión de la RdRp 3D del virus de encefalomiелitis murina tiene efectos antivirales contra este y otros virus [79, 82]. Se cree que el mecanismo que opera está relacionado a cambios en la estequiometría de la proteína, lo cual sugiere que es importante mantener un apropiado nivel de la RdRp para beneficio del virus. De hecho, se ha reportado que los niveles de expresión de RdRp de Sindbis virus, TYMV, HCV y HAV es regulado por el sistema UPS [78, 83-85].

Los virus pueden regular la respuesta inmune mediante la degradación del complejo de histocompatibilidad de clase I (MHC) para reducir la presentación de antígeno [86]. Un ejemplo lo encontramos con citomegalovirus, que emplea a dos de sus proteínas virales, US2 y US11, para inducir la retrotranslocación del complejo MHC de clase I del RE a citoplasma, donde es ubiquitinado y degradado por el proteasoma [87]. Otra vía para regular la respuesta inmune es impedir la señalización por interferón. La vía de señalización JAK/STAT está involucrada en la expresión de genes de respuesta a interferón, por lo que algunos virus toman como estrategia la degradación de STAT vía proteasoma, ya que en presencia de inhibidores del proteasoma se restauran los niveles de esta proteína; como es el caso de simian virus y parainfluenza [88].

La salida del virus de la célula es otro proceso en el que se ha visto involucrado el UPS. De hecho ha sido reportado que la maquinaria de ubiquitinación es importante para salida de virus envueltos de RNA, como los retrovirus. Un ejemplo, es el caso del virus del sarcoma

de Rous, en el cual se demostró que el uso de drogas que disminuyen la cantidad de ubiquitina libre en la célula resulta en una drástica disminución de partículas virales y este efecto se revierte cuando se sobre expresa ubiquitina o cuando se fusiona la ubiquitina al C-terminal de la proteína viral Gag, la cual se encarga de la gemación y liberación del virus [75].

La regulación de la actividad transcripcional es otro proceso regulado por la ubiquitinación de manera independiente de la degradación. El virus de la leucemia de células T es un retrovirus que codifica al activador transcripcional Tax, el cual modula la expresión de muchos genes celulares. Se ha descrito que este activador tras ser monoubiquitinado, su actividad transcripcional disminuye de manera independiente al efecto proteolítico del proteasoma [89].

La apoptosis o muerte celular en estados tardíos de la infección puede facilitar la salida del virus. Sin embargo, una muerte celular prematura resulta en una disminución de la replicación viral. Por lo cual, los virus han desarrollado varias estrategias para suprimir o retrasar la apoptosis durante etapas tempranas de la infección para dar tiempo suficiente para la producción de altos títulos de progenie viral. La proteína supresora de tumores p53 es un importante factor de transcripción que regula el crecimiento, modulando procesos que llevan a la apoptosis y a la replicación del DNA. p53 ha sido reportado que interviene en la replicación de diferentes virus como HIV, SV-40, hepatitis B y herpesvirus [90-92]. Por lo cual, los virus han desarrollado estrategias para regularlo. Por ejemplo, ha sido usado como blanco por algunos virus como coxsackievirus y se ha observado que tras 3 horas de infección, los niveles de p53 caen drásticamente y desaparecen a las 5 horas post infección. Esta reducción es bloqueada cuando se usan inhibidores del proteasoma, lo cual sugiere que este virus ha desarrollado una estrategia a través del UPS para inhibir la apoptosis mediante la degradación de p53 [93].

Se ha observado que el proteasoma tiene propiedades antivirales, ya que su inhibición promueve la replicación viral. El proteasoma tiene actividad de RNAsa y es capaz de degradar el RNA viral, como es el caso del virus del mosaico del tabaco, el virus del mosaico de la lechuga y el virus de papaya PRSV [94-96]. En el caso del virus de papaya, el tratamiento con drogas que inhiben el proteasoma resulta en un incremento de más de dos veces en el título viral, así como un aumento en la cantidad de RNA viral. De igual forma, se

ha visto que este fenómeno se puede reproducir sobre expresando la proteína viral Hcpro, la cual se puede unir al proteasoma y es capaz de inhibir tanto su actividad proteasa como RNAsa [95].

3. Justificación

Las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En el 2014 ocuparon en México uno de los primeros lugares de mortalidad en niños (DGE [Dirección General de Epidemiología], 2017. México). Estudios epidemiológicos han encontrado que astrovirus es una de las principales causas de gastroenteritis viral en niños a nivel mundial, así como un agente importante en encefalitis tanto en animales como en humanos [2, 3, 6, 8, 11].

Se ha reportado que el sistema ubiquitin proteasoma juega un papel muy importante durante el ciclo de replicación de virus de RNA de polaridad positiva [78, 83-85]. Por lo cual, estudiarlo, podría darnos una idea más clara del mecanismo que emplea el virus para tomar el control celular durante la infección.

3.1 Hipótesis

El sistema ubiquitin proteasoma es necesario para la replicación de astrovirus humano.

3.1.1 Objetivo general

Establecer si el sistema ubiquitin proteasoma se necesita en el ciclo de replicación de astrovirus humano.

3.1.2 Objetivos particulares

- 1.- Determinar si inhibir el sistema UPS reduce la replicación viral.
- 2.- Determinar en qué momento de la infección es necesario el sistema UPS.
- 3.- Determinar que componente del UPS se necesita para la replicación viral.
- 4.- Evaluar el mecanismo por el cual el sistema UPS se requiere para la replicación viral.

3.2 Materiales y métodos

Células, virus y reactivos

Células C2Bbe1 derivadas de cáncer de colon humano Caco-2 (las cuáles en nuestras manos son 15 veces más transfectables que Caco-2) fueron compradas del American Type Culture Collection y propagadas en una incubadora al 10% de CO₂ a 37°C en medio Dulbecco's modified Eagle's medium-High glucose (DMEM-HG) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. Cat. D7777-10X1L), suplementado con aminoácidos no esenciales (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA Cat. 1140) y 10% de suero fetal bovino (Cansera, Ontario, Canadá). La cepa de astrovirus humano (HAstV) serotipo 8 fue aislada en nuestro laboratorio y se propagó como se ha descrito en otros artículos [55, 97]. El interferente de RNA contra ubiquitina C (siRNA UBC) fue comprado a Dharmacon Research (Lafayette, CO) (Cat. M-019408-01). Los anticuerpos policlonales anti conejo y anti ratón (hechos en cabra y conjugados a peroxidasa de rábano) se compraron a Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA), el anticuerpo monoclonal anti tubulina (clona TU-01) fue comprado a Invitrogen (Cat. 138000). El anticuerpo policlonal de conejo contra ubiquitina fue comprado a Cell Signaling (Cat. 39335). El anticuerpo secundario acoplado a alexa-647 fue comprado a Molecular Probes (Cat. A32733). Los anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína de cápside VP90/VP70 de HAstV (Yuc8), así como contra la proteasa y la polimerasa viral (RdRNAPol) fueron diseñados en nuestro laboratorio, como se ha descrito previamente [35]. Los inhibidores de proteasoma como PSI, MG132, Lactacystin (Proteasome Inhibitor Set I, Cat. 539164) y el inhibidor de E1 Pyr41 (Cat. 662105) se compraron a Calbiochem.

Determinación de la progenie viral

Las células fueron crecidas hasta llegar a confluencia en placas de 96 pozos en un volumen de 150 µl de DMEM-HG. Posteriormente fueron lavadas con 100 µl de medio MEM (Minimum Essential Medium) (Invitrogen) un par de veces e infectadas con Yuc8 a una MOI (Multiplicidad de infección) de 3 ffu/célula en un volumen de 50 µl durante una hora a 37°C y el virus no unido se removió por un par de lavados con medio MEM. Las células se incubaron con 75µl de medio MEM suplementado con aminoácidos no esenciales 1X. Cuando fue necesario, se usaron las drogas descritas, a los diferentes tiempos indicados. Las drogas fueron agregadas al final de la adsorción del virus y permanecieron hasta el tiempo

de colecta, a menos que se indique lo contrario y se laven como se ha mencionado. Las células fueron colectadas a los tiempos indicados y lisadas por tres ciclos de congelamiento/descongelamiento. Posteriormente, el virus presente en el lisado fue activado incubando con tripsina a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ durante una hora a 37°C. La tripsina se inactivó agregando un volumen igual de medio DMEM-HG suplementado con 10% de suero fetal bovino. El título viral fue determinado mediante ensayos de focos infecciosos por inmunoperoxidasa [18]. En placas de 96 pozos se colocaron 100 μl de MEM y se hicieron diluciones seriadas dobles de cada uno de los tratamientos empezando con una dilución 1:100 del lisado celular. Células crecidas a confluencia en placas de 96 pozos fueron lavadas un par de veces con medio MEM y se incubaron con 50 μl de cada dilución durante una hora a 37°C en 10% de CO₂. Posteriormente fueron lavadas dos veces con medio MEM e incubadas durante 18 h con 75 μl de medio MEM. Al final del periodo, se retiró el medio y se incubó con acetona al 80% en buffer de fosfatos PBS 1X durante 20 minutos. Las células se lavaron tres veces con 100 μl de PBS 1X y se incubaron con 50 μl de una dilución 1:1000 en PBS 1X del anticuerpo anti Yuc8 durante 3 horas a 37°C. Después de este tiempo, las células se lavaron un par de veces con 100 μl de PBS 1X y se incubaron con 50 μl de una dilución 1:3000 del anticuerpo secundario proteína A-peroxidasa (Amersham-Pharmacia Biotech) durante una hora a 37 °C. El medio se retiró y se realizó un par de lavados con PBS 1X y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente con el sustrato de la peroxidasa, 3-amino-9etil-carbazole (Sigma Chemicals), el cual produce un precipitado de color marrón. Al final de este tiempo se lavaron las células con agua de la llave y se dejaron secando para el conteo de focos. Se tomó la dilución en la que se observaran alrededor de 200 a 300 focos infecciosos (células teñidas) y se obtuvo las unidades formadoras de focos por mililitro (ffu/ml) con base a la fórmula: 5.5 (factor de corrección de área donde se cuentan los focos) x 20 (factor que representa 50 μl de infección en 1 ml) x número de focos x dilución donde se cuentan los focos.

Western Blots

Las células se infectaron con Yuc8 como se describió anteriormente. A los tiempos indicados, las células fueron lisadas con 1x buffer Laemmli (Tris-Cl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10% y β -mercapto etanol 1%) y hervidas durante 5 minutos [98].

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 12.5% y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA) durante 1 h a 130 mA en buffer de transferencia (CAPS 10 mM, pH 11). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche libre de grasa (Carnation) en PBS 1X-0.1% Tween-20 durante 1 h e incubadas a 4°C toda la noche con los anticuerpos indicados diluidos en PBS 1X-0.1% Tween-20. Se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1X-0.1% Tween-20. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa del rábano (dilución 1:2000) o Alexa 647 (dilución 1:5000) en PBS 1X-0.1% Tween-20 durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1X-0.1% Tween-20. Finalmente las proteínas se detectaron con el sustrato para peroxidasa Western lightning (Perkin-Elmer), siguiendo las instrucciones del proveedor y exponiendo la película hipersensible X-Omat (Kodak). Para las proteínas incubadas con el anticuerpo acoplado a Alexa-647, se detectaron en el equipo Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). Para la detección de ubiquitina se realizaron geles de Tris-Tricina como se ha descrito previamente y se revelaron por peroxidasa [99].

Transfección de siRNA

El siRNA contra ubiquitina (32 nM) se compró a Dharmacon Research (Lafayette, CO) (Cat. M-019408-01) y fue diluido en medio mínimo MEM en un volumen final de 15 µl, mezclado con 90 µl de MEM y 1.34 µl de oligofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) en placas de 48 pozos. La mezcla fue incubada por 20 minutos a temperatura ambiente y se agregó 200 µl de una suspensión de células a una concentración de 100,000 células/ml en DMEM suplementado con 15% de suero fetal bovino. Las células se incubaron durante 48 h a 37°C. La concentración final del interferente fue de 1.5 nM.

Etiquetado metabólico

Las células fueron infectadas a una MOI de 3 e incubadas en presencia o ausencia de MG132 (Calbiochem) a diferentes concentraciones o las células transfectadas con el interferente fueron infectadas como se describió previamente. A 17 hpi, el medio fue reemplazado con Easy-tag Express-³⁵S (Dupont, NEN) manteniendo la misma concentración de MG132 y la

mezcla fue incubada por una hora. Posteriormente las células fueron lavadas y lisadas con buffer 1X Laemmli (ver apartado de Western blot) [98]. Las proteínas se corrieron en geles SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Commassie durante 20 minutos en agitación. Posteriormente, se destiñeron en 10% de ácido acético durante 5 minutos en microondas y se expuso la película hipersensible X-Omat (Kodak) a autoradiografía durante tres días a -70 °C.

Extracción de RNA

Las células C2Bbe1 se crecieron en placas de 6 pozos y se infectaron con Yuc8 a una MOI de 3, se incubaron por 12 h o 24 h en presencia o ausencia de 1 μ M de MG132. El RNA total fue extraído usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA fue resuspendido en agua libre de RNAsas y cuantificado por NanoDrop ND-1000.

PCR cuantitativo (qRT-PCR)

Este ensayo fue realizado de acuerdo al kit de síntesis de cDNA Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA). El análisis cuantitativo fue realizado usando el software Prism 7000 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA). Los iniciadores para amplificar el RNA genómico y antigenómico de la región ORF1b se describieron en artículos previos y dependiendo del iniciador, se amplifica el RNA de la polaridad deseada [51, 100]. Para asegurar que sólo la cadena seleccionada después del RT se amplifique, la muestra se calentó a 90°C durante 15 min y se transfirió a hielo para impedir la renaturalización de la transcriptasa reversa. Posteriormente, se realizó el PCR con ambos iniciadores, los iniciadores para amplificar el RNA subgenómico fueron el forward 5`-TGGAACACTGCCTATCACGG-3` y el reverse 5`-GAAGGCCAGAGTCACGAAGCT-3`. Los resultados fueron normalizados al nivel total del mRNA de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de cada muestra. La abundancia fue normalizada con respecto al RNA viral del control infectado sin la droga de acuerdo al método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

RT-PCR punto final

El RNA genómico y antigenómico fueron cuantificados como se ha descrito previamente [100]. De manera breve, las células fueron colectadas con TRIzol a los tiempos indicados y el RNA cosechado. Se realizó posteriormente las reacciones de transcripción reversa (RT) usando 500 ng de RNA usando la enzima AMV reverse transcriptase (cat: 1372, chimex) and 10 pmoles del iniciador MON348 (5'ACATGTGCTGCTGTTACTATG 3') (para la cadena positiva), MON344 (5'TACAGACATGTGCATGACTGG 3') (para la cadena negativa) o el iniciador inverso de β -actina (5' GCCTCAGGGCAGCGG). La reacción de RT se realizó como sigue: 5 min a 25°C/60 min a 42°C/10 min a 70°C/ enfriado a 4°C. La mezcla de PCR se compone de la enzima Taq DNA polimerasa (cat: MO267S, New England Biolabs) y 2 μ l del cDNA para la cadena negativa y actina; para la cadena positiva una dilución 1:36,000 del cDNA. Además se le agregó el par de iniciadores MON340 (5'CGTCATTATTTGTTGTCATACT 3') y MON348 para la cadena positiva y el par MON343 (5'CAGGCTTTACCCACAT 3') y MON344 para la cadena negativa. Para actina se agregaron el iniciador reverso (5'GCCTCAGGGCAGCGG) y el forward (5' GCTGTGCTATCCCTGTA). El PCR fue realizado como sigue: desnaturalización a 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de amplificación con pasos de desnaturalización de 30 segundos a 94°C, alineamiento de 30 segundos a 55°C y extensión por 30 segundos a 72°C. Se realizó un paso final de extensión a 72°C durante 5 min. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 2% y analizados por typhoon FLA 9500. Las abundancias se normalizaron con respecto al control de carga actina y se tomó como 100% la abundancia del RNA proveniente de la muestra sin MG132.

Liberación de LDH

Se retiró el medio de las células que fueron sometidas a los tratamientos anteriores y se colocó en una placa de 96 pozos. Se adicionó a las células 75 μ l de una solución de lisis (900 μ l MEM + 100 μ l del buffer de lisis del kit Lactate dehydrogenase (Cat: Tox-7)) y se dejó incubando 45 min a 37°C. Se prepara el sustrato de la enzima mezclando volúmenes iguales de cada reactivo. Se toman 40 μ l de cada muestra y su respectivo sobrenadante y se le agrega un volumen igual del sustrato de la enzima. Incubar durante 10 min a T.A. y leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los diferentes experimentos fueron graficados usando el software GraphPad Prism 5. La media aritmética se calculó sumando todos los datos de cada condición y dividiéndolos entre el total de datos. Esta media se graficó junto con el error estándar de la media (SEM), el cual cuantifica la precisión de la media y es una medida de la probabilidad de cuán lejos está la media de su muestra de la media real de la población. El SEM se calculó dividiendo la desviación estándar entre la raíz cuadrada del total de datos. Para decidir si hay diferencias estadísticas entre un tratamiento y el control se tomó como base un P-value menor a 0.05.

4. Resultados

4.1 Inhibidores del proteasoma reducen la progenie viral

Para determinar si el proteasoma participa durante el ciclo de replicación viral de astrovirus, se decidió tratar células C2Bbe1, derivadas de la línea celular CaCo-2, con diferentes drogas que inhiben el proteasoma. La inhibición del proteosoma con MG132 (1 μ M), lactacystin (10 μ M) y PSI (20 μ M) por 18 hpi redujo la progenie viral (más de 10 veces), siendo MG132 el que tiene un efecto mayor (**Figura 6A**). El efecto de estos inhibidores sobre el proteasoma se confirmó por medio de Western blot usando anticuerpos anti-ubiquitina y anti-hsp70. Los tres inhibidores indujeron un aumento en los niveles de proteínas ubiquitinadas (**Figura 6B**) y en los niveles de HSP70 (**Figura 6B**). Como se observó que MG132 tenía mayor efecto sobre la producción de progenie viral (**Figura 6A**), se decidió determinar la concentración a la que esta droga tiene el mayor efecto sin ser tóxica para la célula. Los resultados muestran que a la más baja concentración (0.1 μ M) se redujo la progenie viral 80%, mientras que a 0.3 μ M hay una reducción del 92%, a 1 μ M la reducción fue de 98%, a 3 μ M se redujo 98.7% y finalmente a 10 μ M se redujo 99.1% (**Figura 6C**). Para determinar que el tratamiento con las drogas no fuera tóxico, se realizaron ensayos de viabilidad midiendo la liberación de LDH a los tiempos y concentraciones evaluados, encontrando que el tratamiento de la droga con 1 μ M es una concentración a la cual se tiene un resultado similar a la máxima concentración y no induce toxicidad en las células (**Figura 6D**).

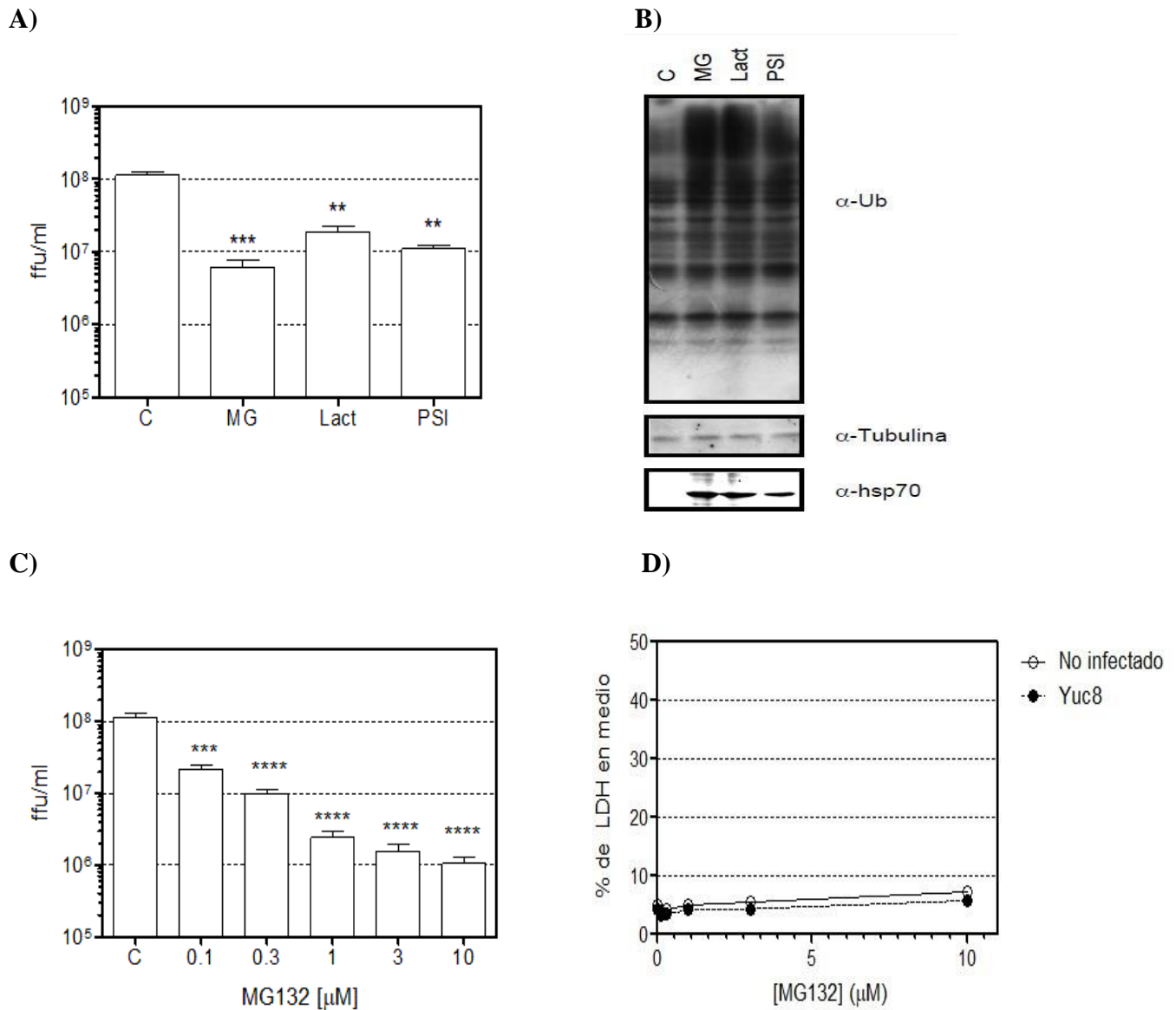


Figura 6. Diferentes inhibidores del proteosoma reducen la replicación de astrovirus. Las células C2Bbe1 se infectaron a una MOI de 3 con HAstV Yuc8. MG132, 1 μM; lactacystin, 10 μM, y PSI, 20 μM se añadieron al final del período de adsorción. A las 18 hpi, los cultivos celulares se cosecharon y analizaron. A) Las células y el medio extracelular se cosecharon al mismo tiempo y el título viral se determinó mediante un ensayo de formación de focos infecciosos por peroxidasa. Los datos se expresan como unidades formadoras de focos (ffu) / ml y representan la media aritmética ± SEM (del inglés error estándar de la media) de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *** P = 0,0007; ** P = 0.0022. B) Las células se cosecharon en buffer de Laemmli, se resolvieron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con los anticuerpos indicados. Como control de carga se determinaron los niveles de tubulina. C) La producción de progenie viral se determinó como se describió anteriormente. Los resultados de esta gráfica representan la

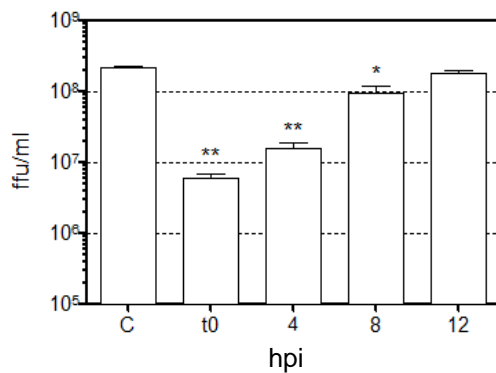
media aritmética \pm SEM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. ***P=0.0007; ****P=0.0002. D) En paralelo a los experimentos del inciso C), se midió la liberación de LDH para analizar la toxicidad del tratamiento.

4.2 El sistema UPS afecta tiempos tempranos de la replicación viral

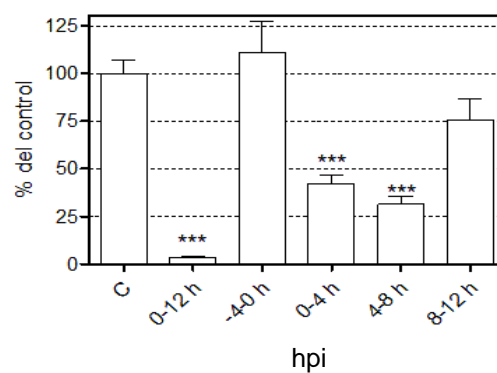
Para evaluar en que evento del ciclo replicativo el sistema ubiquitin proteasoma participa durante la infección, se decidió realizar tratamientos con el inhibidor del proteasoma MG132 a diferentes tiempos post infección. Como se observa en la **Figura 7A**, conforme se agrega la droga a tiempos tardíos de la infección (desde las 8 hpi), se reduce el efecto sobre la progenie viral. Al evaluar diferentes ventanas de tiempo de tratamiento (de 4 h) con el inhibidor (**Figura 7B**). Se observó que el proteasoma no se requiere para la entrada viral, ya que el pretratamiento con el inhibidor no afecta la producción de progenie. Asimismo, los datos sugieren que se requiere mantener inhibido el proteasoma de manera continua durante las primeras 8 h de infección, ya que cuando se inhibe sólo cuatro horas la reducción de la progenie viral es menor comparado al tratamiento de 0-12 h (**Figura 7B**).

Se ha reportado que inhibir este sistema puede sólo retrasar la replicación de poliovirus pero no inhibirla [101]. Para evaluar esta posibilidad, se decidió tratar las células con el inhibidor de manera continua a diferentes tiempos desde 12 hpi hasta 48 hpi. Los resultados de la **Figura 7C** muestran que la inhibición de este sistema no retrasa la replicación viral, sino que induce la inhibición de la misma.

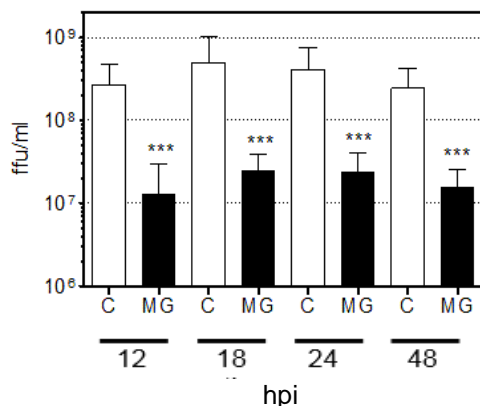
A)



B)



C)



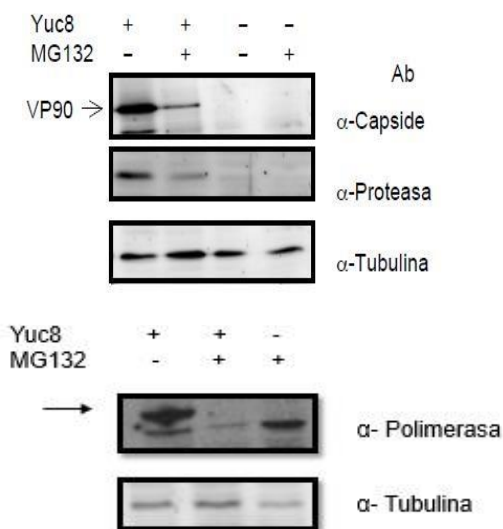
7. El inhibidor del proteasoma, MG132 afecta tiempos tempranos en la replicación de astrovirus humano.

Células C2Bbe1 se infectaron a una MOI de 3 con HAstV Yuc8, y se añadió 1 μ M de MG132 en los diferentes tiempos indicados después de la adición del virus. La producción de progenie viral se evaluó por formación de focos infecciosos mediante tinción con peroxidasa. A) MG132 no se añadió (C) o se añadió en los tiempos indicados después de la adsorción. A las 18 hpi, las células y el medio se cosecharon juntos y las partículas virales infecciosas se titularon. Los datos se expresan como unidades formadoras de focos (ffu)/ml y representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *** P = 0.0040, * P = 0.0162. B) Las células se trataron por periodos de 4 horas. Después de este tiempo el fármaco se eliminó mediante un par de lavados con MEM y se dejó en medio MEM para cosechar a las 12 hpi. En el tiempo "-4-0", MG132 estuvo presente solo durante un período de 4 h (3 h antes de la adsorción y durante el período de adsorción de 1 h, después de este tiempo el fármaco se eliminó mediante un par de lavados con MEM. Los datos se expresan como porcentaje de progenie normalizado al control y representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *** P = 0.0001 y ** P = 0.004 C) Se infectaron células C2Bbe1 con una MOI de 3 con HAstV Yuc8. Al final del período de adsorción, las células se lavaron y se añadió 1 μ M de MG132, en los tiempos indicados. Las células y los medios se recogieron juntos y el título viral se determinó mediante un ensayo de formación de focos, como se describe en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como unidades formadoras de focos (ffu) / ml y representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *** P = 0.0007. Las barras en blanco son el control de células tratadas con DMSO (C) y las barras en negro son células tratadas con MG132 (MG).

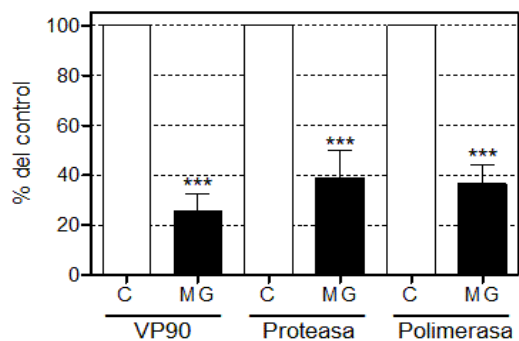
4.3 La actividad del proteasoma se requiere para la expresión de las proteínas virales

Para evaluar el efecto de inhibir el sistema UPS en la producción de proteínas virales, se analizó el efecto de MG123 en la abundancia de las proteínas estructurales y no estructurales en células infectadas y tratadas con MG132 durante 18 hpi de incubación. Como se observa en la **Figura 8 A y B**, el tratamiento con la droga disminuye la acumulación de la proteína estructural VP90 y la proteasa en alrededor de 80% y 60%, respectivamente. Asimismo, se observa la reducción en la abundancia de la polimerasa viral en alrededor de 70% en presencia del inhibidor. Sin embargo, se ha reportado que MG132 puede inhibir la traducción celular [99, 102]. Para descartar esta la posibilidad, se decidió evaluar la traducción de las proteínas celulares y virales mediante la incorporación metabólica de S³⁵-Met con concentraciones crecientes de MG132, Los resultados muestran que incluso a la concentración más alta (10 μ M), no se observa una inhibición de la traducción celular, sugiriendo que la reducción en la abundancia de las proteínas virales inducida por la droga es específica sobre las proteínas virales (**Figura 8 C y D**).

A)



B)



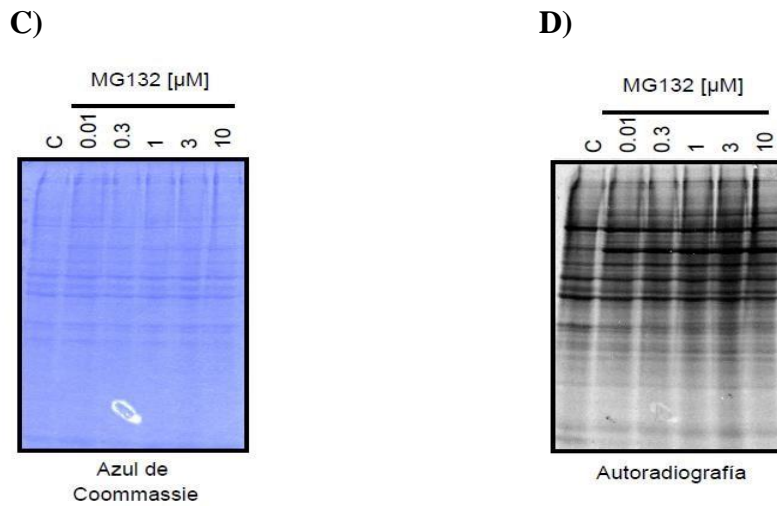


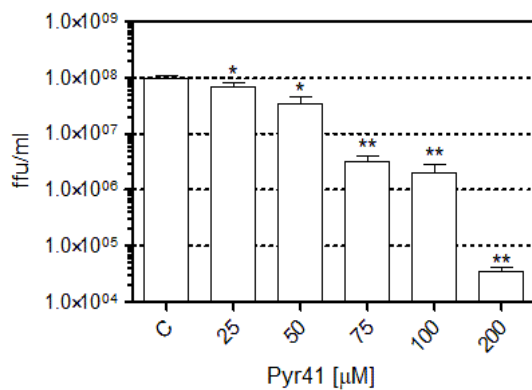
Figura 8. La inhibición del proteasoma reduce la abundancia de las proteínas virales. Se infectaron células C2Bbe1 a una MOI de 3 con HAstV Yuc8, y al final del período de adsorción, se añadió MG132 a las concentraciones indicadas. Las proteínas se marcaron metabólicamente con ^{35}S -metionina/cisteína durante 1 hora a 17 hpi, y las células se recogieron a 18 hpi en buffer Laemmli y las proteínas se resolvieron mediante SDS-PAGE. A) Se realizó Western blot de las proteínas indicadas de células infectadas o no infectadas en presencia o ausencia de MG132 1 μM (la flecha indica la banda de la polimerasa viral). B) Cuantificación del nivel de expresión de la proteína viral en cada condición normalizada con respecto a células tratadas con DMSO (C) usando tubulina como control de carga. Los datos se expresan como % de células control (infectadas, tratadas con DMSO) y representan la media \pm SEM de cinco experimentos independientes para VP90 y la proteasa viral. *** $P < 0.001$. Se muestra la cuantificación de la polimerasa viral y representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. *** $P < 0.0001$. C) Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie como control de carga de la autoradiografía en D). D) Incorporación metabólica de S^{35} Met en proteínas celulares marcadas a las 17 hpi durante una hora en presencia de las concentraciones indicadas de MG132 y reveladas después de tres días de exposición.

4.4 Se requiere de la ubiquitinación para la eficiente replicación de astrovirus

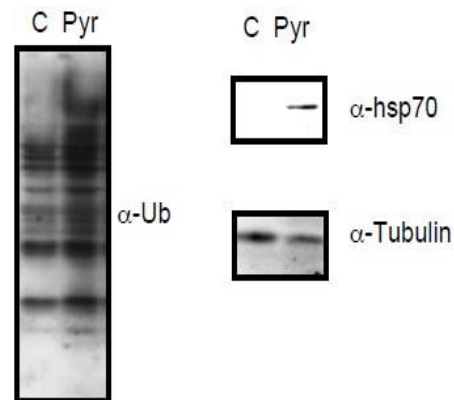
Los datos mostrados hasta ahora sugieren que al inhibir el proteasoma, se reduce la replicación viral y la síntesis de las proteínas virales. Sin embargo, debido a que la degradación de proteínas por el proteasoma puede ser o no dependiente de ubiquitina, decidimos evaluar la participación de la ubiquitinación durante la infección viral [103]. Si se requiere de ubiquitina para la replicación viral, cualquier tratamiento que afecte el proceso de ubiquitinación o su abundancia resultará en una disminución de la replicación viral. Para

analizar esta posibilidad, las células fueron tratadas con Pyr41 un inhibidor de la enzima activadora de ubiquitina E1 y se evaluó la producción de progenie viral bajo estas condiciones. Como se observa en la **Figura 9 A**, el tratamiento reduce la progenie viral siguiendo un comportamiento dosis respuesta sin presentar toxicidad para las células (**Figura 9 E**). Asimismo, para demostrar el funcionamiento de la droga, se realizaron WB contra ubiquitina y hsp70 (**Figura 9 B**), ya que se ha reportado que en presencia de la droga, las células aumentan el número de proteínas poli ubiquitinadas y se induce la síntesis de proteínas de choque térmico. Como control de toxicidad de la droga, se realizaron ensayos de liberación de LDH, los cuáles mostraron que la droga no es tóxica para la célula hasta una concentración de 100 μM , ya que a 200 μM , a pesar de haber una reducción de la progenie viral en más de 3 logaritmos, se observa que es tóxica (**Figura 9 A y E**) [104]. De manera similar al tratamiento con inhibidores del proteasoma, el tratamiento con la droga redujo la abundancia de las proteínas virales en alrededor del 80% (**Figura 9 C y D**). Estos datos sugieren que el proceso de ubiquitinación es requerido para una replicación eficiente.

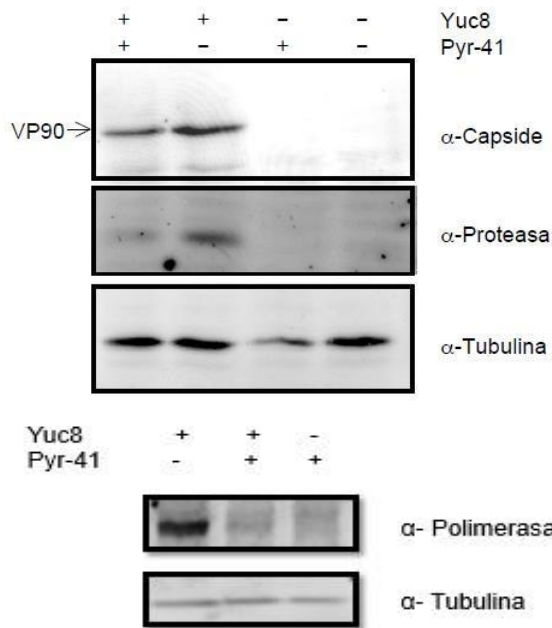
A)



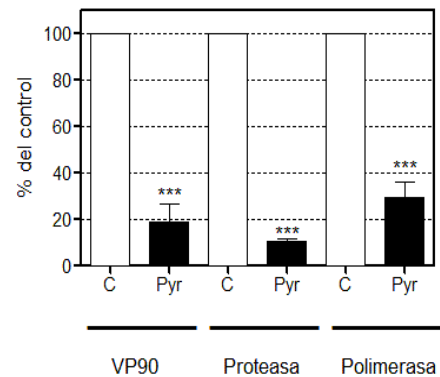
B)



C)



D)



E)

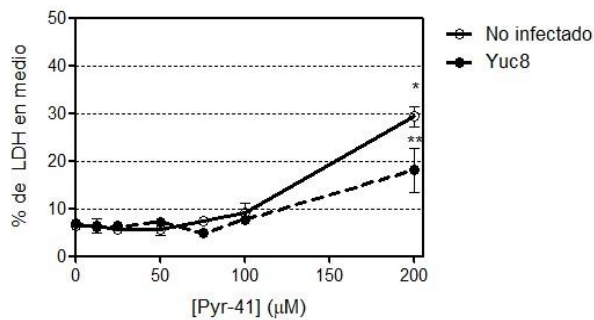


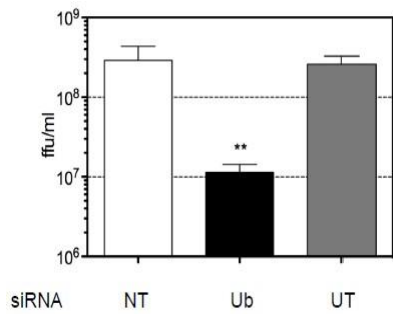
Figura 9. El inhibidor de ubiquitinación Pyr-41 reduce la producción de progenie y síntesis de proteínas virales. Las células C2Bbe1 se infectaron con una MOI de 3 de HAstV Yuc8. Al final del período de adsorción, se añadió Pyr-41 en las concentraciones indicadas, y luego las células se cosecharon a 18 hpi. A) Las células y el medio se tomaron juntos y se evaluó el título de la progenie viral producida. Los datos se expresan como ffu/ml y representan la media de tres experimentos independientes realizados por duplicado \pm SEM. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$. B) Las células C2Bbe1 infectadas con Yuc8 se incubaron durante 18 h con 100 μ M de Pyr41 (Pyr) o DMSO (C). Las células se cosecharon en buffer Laemmli, se resolvieron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para la detección de la proteína indicada. C) Análisis de Western blot de las proteínas indicadas de células infectadas o no infectadas en presencia o ausencia de Pyr-41 100 μ M (Pyr-41). La inmunodetección se realizó usando anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 647. D) Cuantificación de los valores normalizados (usando tubulina como control de carga) de expresión para la

proteína viral indicada en células tratadas con DMSO (C) o Pyr-41 (Pyr), los datos se expresan como % del control (células tratadas con DMSO) y representan la media \pm SEM de cinco experimentos independientes para VP90 y la proteasa viral. *** P <0.001. Para la polimerasa viral se representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. *** P <0.0001. E) Se muestra el ensayo de liberación de LDH en el medio extracelular como control de citotoxicidad de la droga a las diferentes concentraciones indicadas.

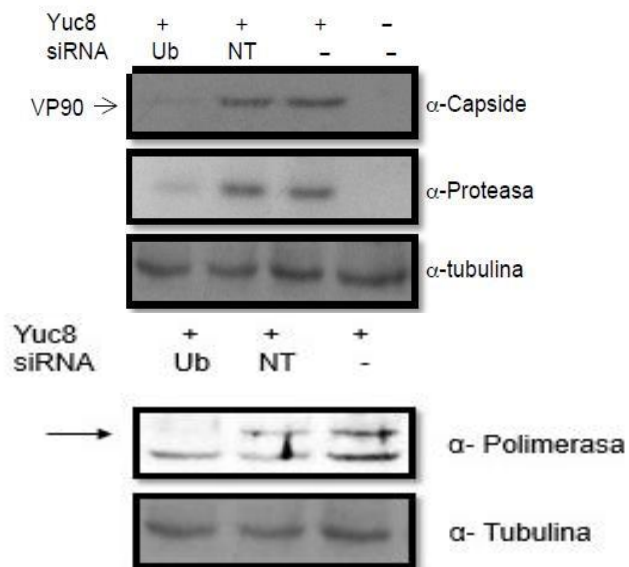
Para corroborar la participación de la ubiquitinación en la replicación viral, se realizaron ensayos de interferencia contra el gen *ubc*, uno de los cuatro genes que codifican para ubiquitina en células C2Bbe1 [105]. Para evaluar si la reducción en los niveles de ubiquitina afecta la producción de progenie viral se realizaron ensayos de producción de focos infecciosos en células interferidas. Los resultados de la **Figura 10 A** muestran una reducción en la progenie viral de más de un logaritmo, similar a los resultados previos con el inhibidor Pyr 41 (ver **Figura 9A**).

Para determinar si los niveles de las proteínas virales se reducen bajo el tratamiento, se cosecharon las proteínas totales y se realizaron ensayos de WB. En la **Figura 10 B** y **C** se observa que el tratamiento disminuye la síntesis de proteínas virales en alrededor de 80%, similar a la previamente observada en los otros tratamientos. La eficiencia de la interferencia de ubiquitina fue del 95% como se observa en los niveles de mono ubiquitina de la **Figura 10 D**. De igual forma, para demostrar que el ensayo de interferencia no apaga la traducción celular, se realizó el ensayo de incorporación metabólica de metionina radioactiva como se observa en esta misma figura y se realizaron ensayos de liberación de LDH para comprobar la toxicidad de la interferencia, la cual no fue tóxica bajo las condiciones manejadas (**Figura 10 E**). Los resultados sugieren que la ubiquitinación es necesaria para la replicación eficiente del virus.

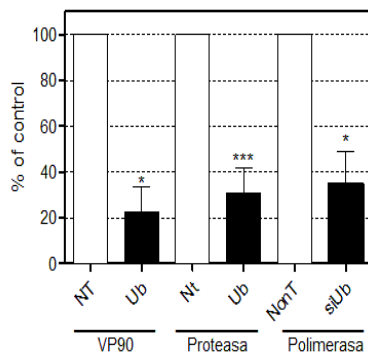
A)



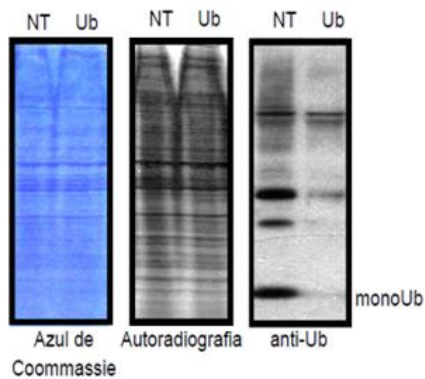
B)



C)



D)



E)

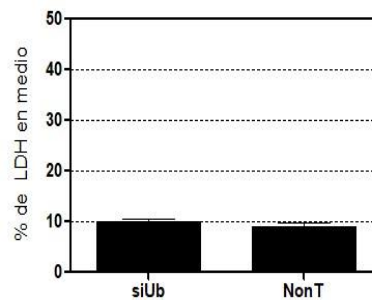


Figura 10. La interferencia de ubc reduce la producción de progenie y síntesis de proteínas virales. Las células C2Bbe1 se transfectaron con un RNA interferente (siRNA) dirigido al gen *ubc* (Ub), un control irrelevante (NT) o no se transfectaron (UT), 48 horas después de la transfección, las células se infectaron con HAstV Yuc8 a una MOI de 3. A) Se cosecharon las células y medios extracelular a las 18 hpi y el título viral se determinó mediante ensayos de formación de focos infecciosos teñidos con peroxidasa. Los datos se expresan

como ffu/ml y representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. ** P = 0.004. B) Las proteínas se cosecharon a 18 hpi en buffer Laemmli, se resolvieron mediante SDS-PAGE y se procesaron para inmunodetección usando los anticuerpos indicados. C) Cuantificación del valor normalizado (usando tubulina como control de carga) de la expresión de las proteínas virales indicadas en células infectadas transfectadas con el siRNA NT o Ub, los datos se expresan como % de células control (transfectadas con NT siRNA) y representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes * P <0.02, *** P <0.001. D) Las células transfectadas con el siRNA indicado se marcaron metabólicamente con ³⁵S-metionina/cisteína durante 1 hora a 17 hpi, posteriormente se cosecharon en buffer de muestra Laemmli y se resolvieron mediante SDS-PAGE. Se muestran gel teñido con azul de Coomassie, autorradiografía y Western blot anti ubiquitina (anti-Ub). Para detectar monoubiquitina, las proteínas se resolvieron en geles de Tris-tricina. E) Como control de citotoxicidad de la interferencia se realizaron ensayos de liberación de LDH a las 48 h post transfección, resultando que el tratamiento no es tóxico.

4.5 El inhibidor del proteasoma MG132 no disminuye la poza de ubiquitina monomérica

Se ha demostrado en algunos casos que el tratamiento continuo con drogas que inhiben el proteasoma resulta en la reducción de los niveles de ubiquitina libre, ya que el proceso de reciclaje de ubiquitina se detiene [75, 99]. Debido a que el sistema UPS es un sistema de dos componentes, la ubiquitina y el proteasoma, para determinar que componente se estaba afectando al emplear el inhibidor del proteasoma MG132 y descartar la posibilidad que el tratamiento tuviera el efecto deletéreo sobre el virus debido a la falta de ubiquitina más que debido a un efecto sobre la proteólisis, se decidió evaluar los niveles de ubiquitina libre en células tratadas con MG132 mediante Western blot. Los resultados de la **Figura 11** muestran que los niveles de ubiquitina libre no están reducidos bajo este tratamiento sino que se ven aumentadas comparadas al control sin tratar, probablemente como mecanismo compensatorio debido a la falta de reciclaje de la ubiquitina unida a las proteínas celulares. Estos resultados sugieren que la causa del efecto deletéreo de esta droga sobre la producción de progeñe y síntesis de proteínas virales se debe a una falla en la actividad proteolítica del proteasoma.

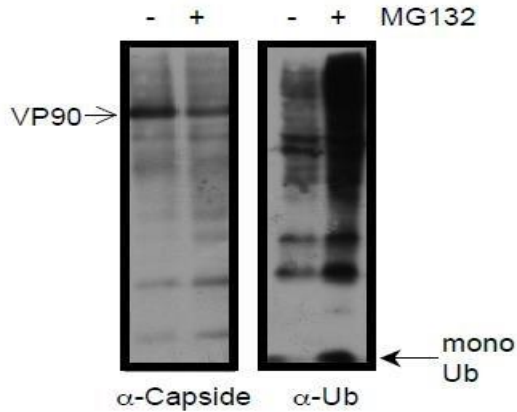


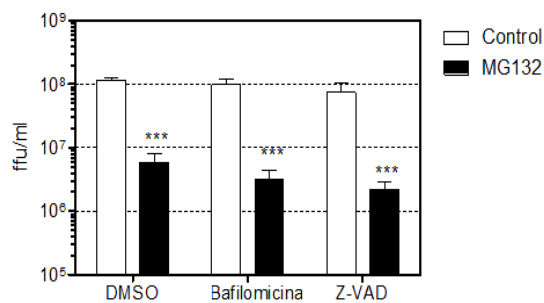
Figura 11. Inhibir el sistema UPS con MG132 no reduce la cantidad de ubiquitina monomérica. Las células C2Bbe1 se infectaron a una MOI de 3 con HAstV Yuc8. Al final del período de adsorción a algunas muestras se les añadió 1 μ M de MG132 y otras muestra en ausencia de este inhibidor, las células se incubaron durante 18 horas a 37°C y se lisaron en buffer Laemmli y se resolvieron en geles Tris-Tricina para inmunodetección de la cápside viral o ubiquitina mediante Western blot. La posición de migración de ubiquitina monomérica está indicada con una flecha.

4.6 El efecto de MG132 en la replicación viral no se debe a la inducción de autofagia o apoptosis

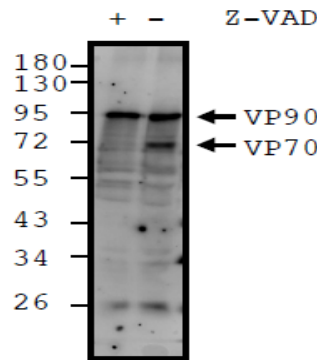
Se ha reportado que la exposición prolongada con inhibidores del proteasoma puede inducir autofagia o apoptosis. La autofagia puede inducir la degradación de proteínas virales o viriones a través de lisosomas, proceso denominado como xenofagia [106]. Además, se sabe que astrovirus induce apoptosis para el procesamiento de la proteína de cápside y liberación del virus [18, 48, 107]. Sin embargo, una inducción temprana de la apoptosis podría inhibir la replicación viral. Por lo cual, decidimos determinar si los efectos negativos sobre la replicación viral observados con el inhibidor MG132, son ocasionados por autofagia o apoptosis. Para ello, usamos drogas que inhiben la autofagia y la apoptosis, como bafilomicina, que inhibe la ATPasa de protones vacuolar y Z-VAD, inhibidor de caspasas. Las células se infectaron y se dejaron incubando con los inhibidores durante 20 h y al final se cosecharon para determinar la progenie viral. Si la autofagia y la apoptosis participan en la reducción de la progenie viral inducidos por MG132, el tratamiento con inhibidores que revierten estos eventos, recuperarían la producción de progenie viral. En la **Figura 12** podemos observar que el tratamiento con inhibidores de autofagia o apoptosis no recuperan

la producción de progenie viral, por lo cual podemos concluir que el efecto de MG132 es específico sobre la actividad proteolítica. Para demostrar que las drogas estuvieran funcionando, se evaluó el procesamiento de la proteína estructural VP90 hacia VP70, lo cual se ha reportado es lo único que se afecta en presencia de Z-Vad y se observó que dicho procesamiento se inhibe, (**Figura 12 B**) [18]. De igual forma se evaluó la entrada del virus en presencia de bafilomicina y se observó que se inhibe la entrada del virus, como se ha reportado previamente por ensayos de infectividad (**Figura 12 C**) [58]. Estos resultados sugieren que los efectos de MG132 son específicos sobre la actividad proteolítica del proteasoma.

A)



B)



C)

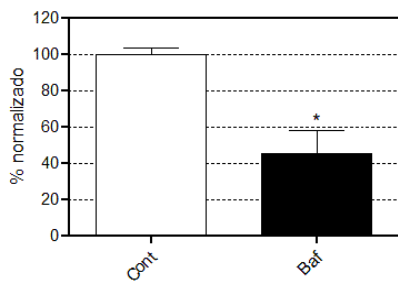


Figura 12. El efecto de MG132 no se debe a la inducción de autofagia o apoptosis. Las células se infectaron a una MOI de 3 con Yuc8, y al final del período de adsorción se añadieron los fármacos indicados. A las 20 hpi, las células se cosecharon, se lisaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación, y el título viral se determinó mediante un ensayo de formación de focos infecciosos. Los datos se expresan como unidades formadoras de focos (ffu)/ml y representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *** P = 0.0007. B) Como control del funcionamiento de Z-Vad, se analizó el

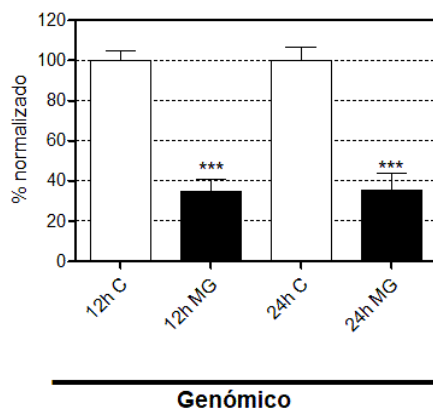
procesamiento de la proteína estructural VP90 hacia VP70. C) Como control de que bafilomicina funciona en el ensayo se decidió evaluar la entrada del virus por ensayos de infectividad en células tratadas previamente una hora con la droga y durante la adsorción del virus. Las concentraciones de los inhibidores utilizados fueron: MG132, 1 μ M; Bafilomicina, 50 nM; Z-VAD, 50 μ M.

4.7 La inhibición del proteasoma reduce la abundancia de los RNA de polaridad positiva

La reducción en la abundancia de las proteínas virales por la presencia de MG132 podría deberse a una falla en la traducción del RNA genómico y sub genómico o una disminución en la síntesis de los RNA virales. Para determinar alguna de estas posibilidades, inicialmente decidimos evaluar la abundancia del RNA genómico y anti genómico mediante PCR punto final, lo cual ya ha sido reportado previamente [100].

Se cuantificaron las abundancias del RNA genómico y antigenómico a las 12 y 24 hpi en presencia de MG132. Los resultados muestran que el RNA genómico disminuye alrededor de 70% a los dos tiempos de infección. Sin embargo, para el caso del RNA antigenómico sólo se observa una disminución del 60% a las 24 hpi pero no a las 12 hpi. Esta reducción del antigenómico a las 24 h podría explicarse ya que el RNA genómico es usado como templado para la síntesis del antigenómico y una reducción en el genómico eventualmente resultaría en un reducción del antigenómico a tiempos tardíos (**Figura 13**).

A)



B)

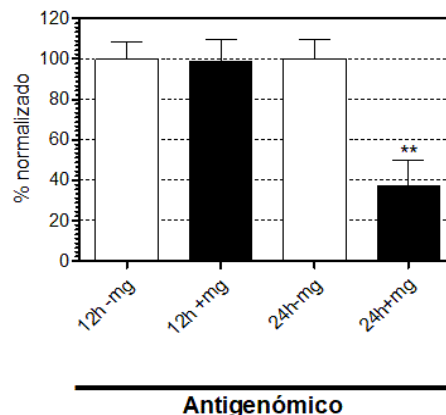


Figura 13. Determinación de las abundancias de los RNA virales mediante RT-PCR punto final. Los RNAs genómico y antigenómico fueron cuantificados como se describió previamente [108]. De manera breve, se extrajo el RNA con Trizol a los tiempos indicados como indica la compañía. Las reacciones de RT fueron realizados con 500 ng de RNA usando los oligos Mon 348 para la cadena positiva, MON344 para la cadena negativa o el oligo de β -actina como control de carga (5'GCCTCAGGGCAGCGG 3'). Posteriormente se realizó el PCR y los productos de amplificación fueron corridos por electroforesis en geles de agarosa al 2% y analizados por quimioluminiscencia utilizando el equipo typhoon FLA 9500 después de teñir con bromuro de etidio. A) Se muestra la cuantificación del RNA genómico y representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado, *** P = 0.0001. B) Se muestra la cuantificación del RNA antigenómico y representan la media aritmética \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado, ** P = 0.0026.

Para corroborar los resultados anteriores, se realizaron ensayos de PCR cuantitativo (q-RT-PCR) de los RNA virales a los dos tiempos de infección en presencia de MG132 (**Figura 14**). Los resultados muestran que la abundancia del RNA genómico se reduce en ambos tiempos de tratamiento alrededor de 80%, con respecto al RNA proveniente de células infectadas sin tratar con el inhibidor. Asimismo, la abundancia del RNA antigenómico no se ve reducida a las 12 h, pero si a las 24 h de tratamiento, en alrededor de un 70% con respecto al control sin tratar.

Ya que la síntesis de la proteína de cápside se ve reducida en presencia del inhibidor del proteasoma (ver **Figura 8 A**), es posible que el RNA subgenómico que lo codifica también se reduzca por el tratamiento. Para determinar si es el caso, se diseñaron oligos para el ORF2 del RNA viral, el cual se encuentra presente en los dos tipos de RNA de polaridad positiva. Los resultados en la figura muestran que en presencia de la droga hay una reducción de alrededor del 50% a los dos tiempos de tratamiento. Los resultados sugieren que el tratamiento con MG132 resulta en la reducción de los RNA virales de polaridad positiva (genómico y subgenómico) y como consecuencia del antigenómico a tiempos tardíos. A pesar de que este oligo no permite distinguir entre la abundancia del RNA G y SG, se ha reportado en la literatura que la abundancia del RNA SG es diez veces mayor que la abundancia del RNA G para Astrovirus humano 1 y en nuestras manos observamos resultados similares para Yuc 8 (datos no mostrados), por lo cual los datos representan mayoritariamente los valores del RNA subgenómico [109].

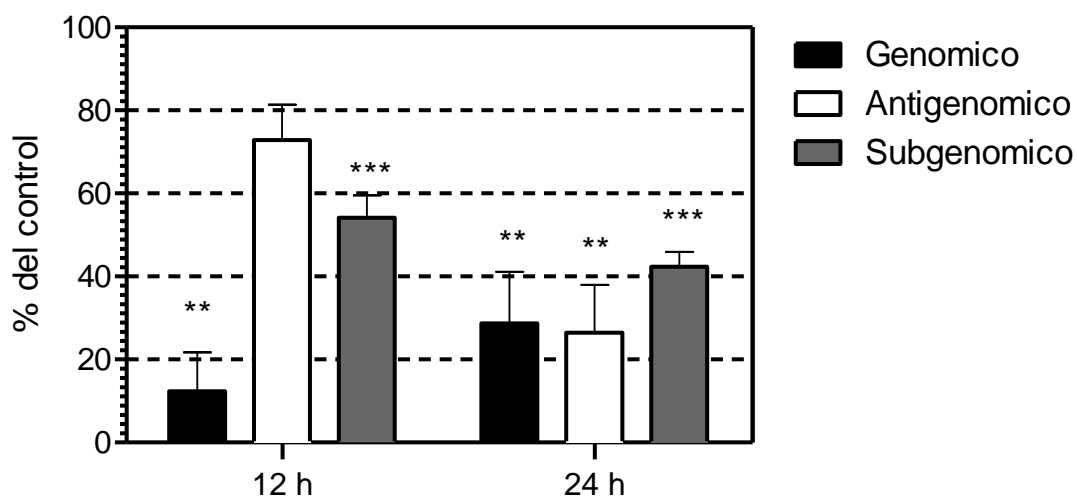


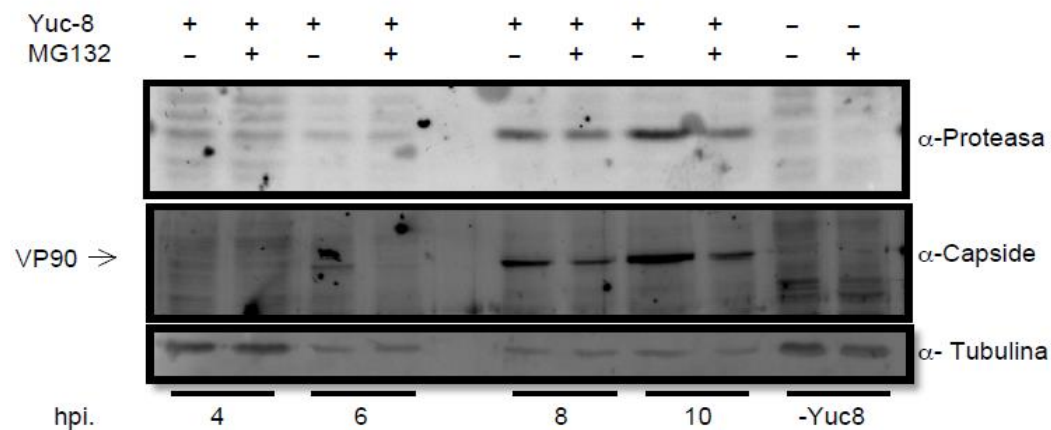
Figura 14. MG132 reduce la abundancia del RNA genómico y sub genómico. Las células C2Bbe1 se infectaron a una MOI de 3 con HAstV Yuc8. Al final del período de adsorción, se añadió 1 μ M de MG132 o DMSO, y las células se incubaron durante los períodos de tiempo indicados y se aisló el ARN total. Los niveles de ARN genómico, antigenómico y subgenómico (ORF2) se determinaron mediante qRT-PCR, como se describe en Materiales y métodos. Los datos se expresan como % de las células tratadas con respecto a células tratadas con DMSO como control, que se tomó como 100%, y representan la media \pm SEM de tres (genómico y antigenómico) o cinco (subgenómico) experimentos independientes, * P <0,05, ** P \leq 0,01, ***P \leq 0,001.

4.8 La inhibición del proteasoma no afecta la primera ronda de traducción de las proteínas virales

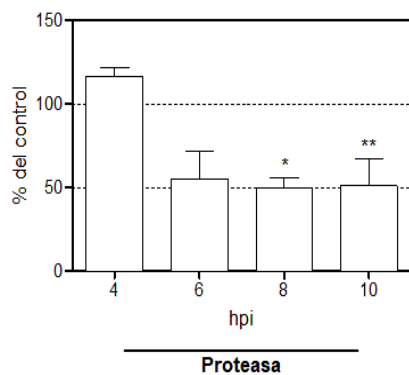
Los resultados previos sugieren que inhibir el proteasoma con MG132 afecta la abundancia de los RNA virales de polaridad positiva (genómico y subgenómico), pero no del antigenómico (Figura 14). En este aspecto, durante la entrada de la partícula viral, este libera su RNA genómico, el cual es usado para la síntesis de la poliproteína, entre las cuáles están la polimerasa y la proteasa. La polimerasa recién sintetizada usa posteriormente este RNA entrante para la síntesis del antigenómico, que es usado como templado para producir las cadenas de polaridad positiva. Una posibilidad es que el tratamiento con MG132 interfiere con la primera ronda de traducción que da origen a las proteínas virales no estructurales como la polimerasa viral, por lo cual una reducción en la síntesis de la polimerasa viral explicaría la reducción de los RNA virales. Para evaluar esta posibilidad, decidimos infectar y analizar la producción de la proteasa viral a tiempos tempranos, 4, 6, 8 y 10 hpi en presencia de

MG132. Como se observa en la **Figura 15**, los niveles de la proteasa viral no se ven afectados a las 4 hpi y en concordancia con los resultados previos, su abundancia se reduce a tiempos tardíos. Estos datos sugieren que la disminución del RNA genómico y subgenómico inducidos por MG132 no se debe a la falla en la síntesis de las proteínas no estructurales, como la polimerasa al inicio de la infección. Asimismo, los niveles de VP90, que proviene del RNA subgenómico, se observan disminuidos desde el momento que es detectado, lo cual concuerda con los resultados del PCR cuantitativo para este RNA (**Figura 14** y **Figura 15**). En conjunto, estos datos sugieren que inhibir el proteasoma no afecta la traducción de los mRNA virales al inicio de la infección, sino más bien a un evento relacionado a la acumulación del RNA genómico y subgenómico.

A)



B)



C)

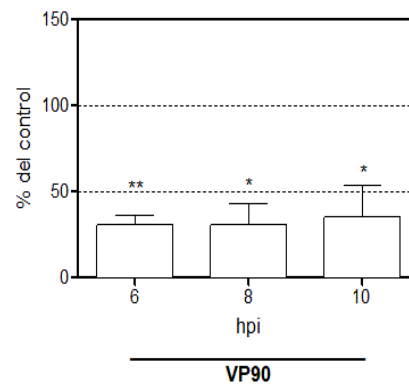


Figura 15. La inhibición del proteasoma no interfiere con la traducción inicial de las proteínas no estructurales. Células C2Bbe1 se infectaron a una MOI de 50 con HAstV Yuc8. Al final del período de adsorción, se añadió 1 μ M de MG132 o DMSO. Las células se incubaron durante los periodos de tiempo indicados y luego se cosecharon en buffer de muestra Laemmli y se resolvieron mediante SDS-PAGE. A) Se muestra Western blot usando los anticuerpos indicados, controles de células no infectadas (MG132 o tratado con DMSO). B) y C) Análisis densitométrico de Western Blot. Los gráficos muestran los valores normalizados (utilizando tubulina como control de carga) de la expresión de la proteasa viral (B) y la proteína de cápside (C) comparados con las células control (tratadas con DMSO). Los datos se expresan como % del control (células no tratadas) y representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * P <0.05, ** P <0.01.

5. Discusión

En este trabajo abordamos el estudio del sistema UPS durante la replicación de astrovirus. Un virus que ha sido poco caracterizado y en el cual no se ha evaluado este sistema. Los hallazgos en este estudio sugieren que se requiere a etapas tempranas de la infección y complementan el modelo establecido por el cual el virus toma el control celular y que se describe a continuación.

Se sabe que el ciclo de replicación viral comienza cuando se reconoce un receptor celular que se ha sugerido pudiera ser un carbohidrato [46]. El virus entra por endocitosis mediada por clatrina y llega hasta endosomas tardíos. El proceso desde la unión a la célula y la liberación de su genoma ocurre en 130 minutos. Este RNA viral entrante es usado para la síntesis de proteínas virales y la formación del centro de replicación [58]. Es en estos centros donde a partir del RNAg se sintetiza el RNAag que sirve como molde para amplificar más RNAg y RNAsg de polaridad positiva. Estos RNAs son exportados fuera del centro de replicación para ser utilizados por la maquinaria de traducción celular para sintetizar la proteína de cápside VP90 y ensamblarse con el RNAg para formar partículas virales, las cuales finalmente son procesadas por caspasas para su salida de la célula y continuar con otra ronda de infección.

Una de las primeras interrogantes era determinar si el sistema UPS era necesario para la replicación de astrovirus, para ello, se realizaron tratamientos con diferentes inhibidores del proteasoma, tanto reversibles como irreversibles, y se observó que inhibir este sistema reduce la producción de progenie y proteínas virales (**Figura 6 A, 8 A y B**). Por otro lado, inhibir

la enzima E1, involucrada en el primer paso de ubiquitinación, con Pyr41 resulta en la reducción de la progenie viral en una manera dependiente de la dosis y como en el caso de inhibición del proteasoma, la abundancia de las proteínas estructurales y no estructurales se reducen durante el tratamiento (**Figura 9 A, C y D**). Asimismo, ensayos de interferencia que reducen la abundancia de ubiquitina en la célula tienen el mismo resultado sobre las proteínas virales y la progenie viral (**Figura 10 A, B y C**). Para descartar la posibilidad que los efectos observados sobre la progenie y proteínas virales sean debidos a la inhibición de la traducción celular, se realizaron ensayos de incorporación metabólica de marca radiactiva. Los resultados mostraron que el tratamiento con estos inhibidores no reducen la síntesis de proteínas celulares y es específico sobre el virus (**Figura 8 C y D/Figura 10 D**).

Para evaluar en qué momento se requiere el UPS, se realizaron tratamientos a diferentes tiempos post infección con el inhibidor del proteasoma y se observó que el requerimiento por el sistema es posterior a la entrada viral y durante las primeras 8 horas de infección ya que cuando se inhibe el sistema a 4 horas, la reducción de la progenie es menor comparada cuando la droga se deja de manera prolongada durante la infección (**Figura 7 A y B**). Se ha reportado para poliovirus que inhibir este sistema no inhibe pero si retrasa la infección, por lo cual se evaluó el efecto en la producción de progenie viral al inhibir este sistema hasta 48 hpi. Los resultados muestran que la progenie viral no se recupera cuando se inhibe este sistema, por lo cual podemos sugerir que es indispensable para la replicación (**Figura 7 C**).

El UPS es un sistema de dos componentes (el proteasoma y la ubiquitina). El tratamiento con MG132, además de inhibir la actividad proteolítica del proteasoma, puede reducir la poza de ubiquitina libre en la célula, para investigar esta posibilidad decidimos evaluar por WB los niveles de ubiquitina libre. Los resultados muestran que la poza de ubiquitina no se ve reducida en presencia del inhibidor del proteasoma, lo cual sugiere que la falta de actividad proteolítica del proteasoma es la responsable de la reducción de la progenie, proteínas y RNA virales de polaridad positiva (**Figura 11**). Asimismo en la **Figura 12** se muestra que el efecto del inhibidor es específico sobre el proteasoma, ya que drogas que inhiben la autofagia o apoptosis, las cuáles se pueden inducir por MG132 y que pudieran ser las causantes de la reducción de la replicación viral; no recuperan la producción de partículas infecciosas.

Un posible mecanismo que explica la reducción en la cantidad de proteína y progenie viral podría ser la reducción en la síntesis de los RNA virales, por lo cual, decidimos evaluar la abundancia de los RNA virales por PCR punto final y qPCR. Los resultados mostraron que las abundancias del RNA genómico y subgenómico (reponsables de la producción de las proteínas virales no estructurales y estructurales, respectivamente) se redujeron cuando se inhibe el proteasoma, pero no para el antigenómico a las 12 h post infección (**Figura 13 y 14**). Una posible explicación sería que cuando el proteasoma está inhibido, la primer ronda de traducción viral estaría afectada y los niveles de la polimerasa viral estarían reducidos y eso explicaría la disminución de los RNA de polaridad positiva. Sin embargo, la **Figura 15** muestra que la traducción inicial de la proteasa, la cual proviene de la poli proteína viral que también contiene a la polimerasa, no se ve afectada a las 4 hpi cuando se encuentra inhibido el proteasoma. Esto sugiere que, la primer ronda de traducción viral, es decir, la traducción del RNA de la partícula viral entrante no se ve afectada cuando se inhibe el proteasoma.

Los datos anteriores indican que las etapas tempranas que tienen que ver con la entrada, el tráfico, desnudamiento de la partícula viral, así como la primera ronda de síntesis de las proteínas virales no están afectadas cuando se inhibe el proteasoma. No tenemos conocimiento del mecanismo que explique lo anterior, pero a continuación se proponen diferentes hipótesis (**Figura 16**).

En la **Figura 16** se sugieren tres posibles hipótesis sobre cómo al inhibir el proteasoma se afectan las abundancias de los RNA virales. La primer hipótesis podría ser que el proteasoma este encargado de degradar o procesar una proteína celular que module de manera directa o indirecta la transcripción eficiente hacia la formación de las cadenas positivas del RNA viral, ya sea que durante la infección hayan al menos dos complejos de replicación, uno donde ocurra inicialmente la formación de la cadena molde de polaridad negativa y otro donde ocurra la síntesis de las cadenas positivas. De hecho, se ha demostrado que el sistema UPS participa en la replicación de brome mosaic virus, señalizando y promoviendo el metabolismo de lípidos, necesarios para la formación del centro de replicación y daños en esta vía trae como consecuencias una caída en la producción de los RNA virales [110]. En el caso de astrovirus se ha reportado la cosegregación de la polimerasa viral con diferentes proteínas celulares involucradas en el metabolismo de lípidos. En este estudio se realizaron

ensayos de interferencia contra proteínas involucradas en la síntesis de colesterol (DHCR7 y CYP51A1) o en la síntesis de ácidos grasos (FASN) y se observó que se reduce la producción del RNA genómico y antígenómico [51].

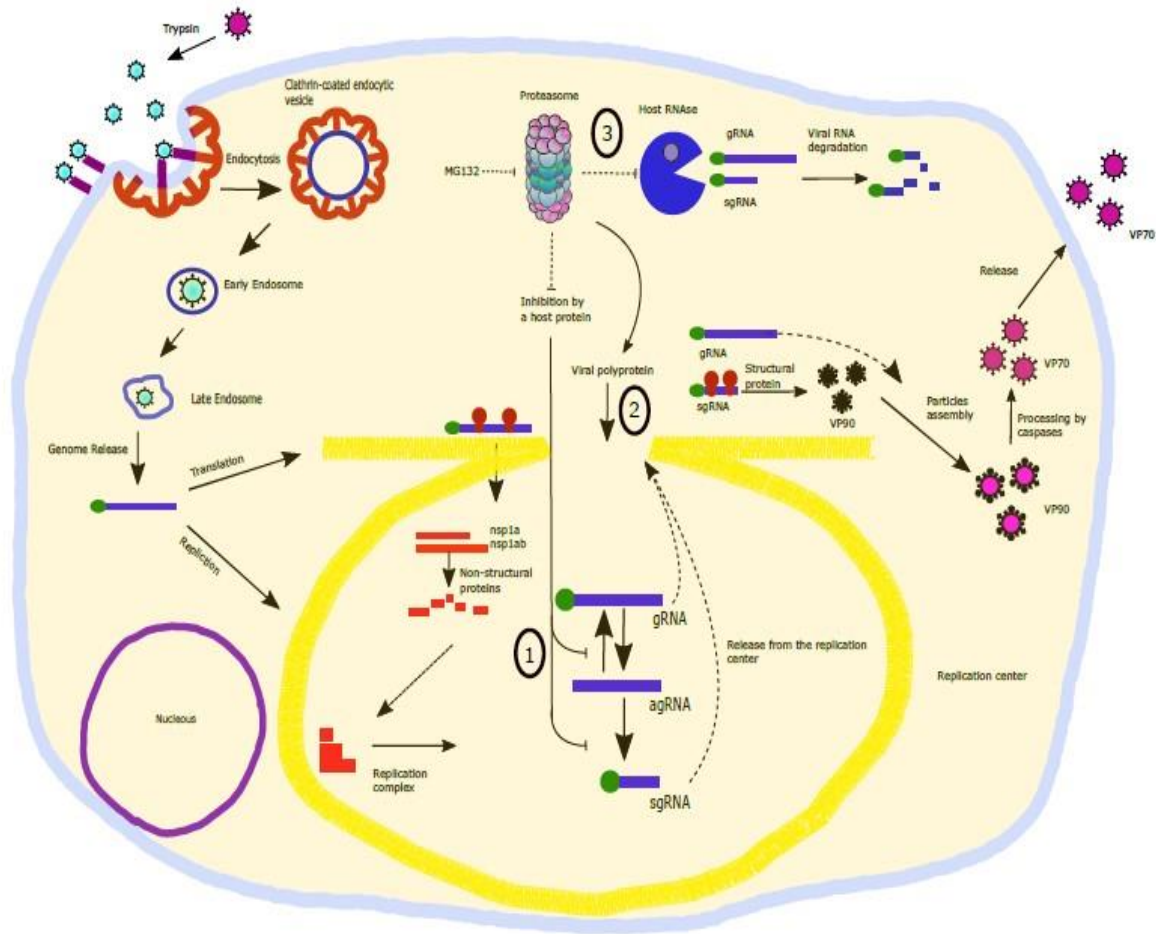


Figura 16. Modelo de la inhibición de la transcripción viral tras inhibir el proteasoma.

La segunda hipótesis es que la actividad del proteasoma regule la estabilidad, procesamiento ó distribución de las proteínas virales; modulando de esta forma la producción de las cadenas positivas y negativas de RNA. De hecho, se ha observado que para rotavirus, un virus de RNA de doble cadena, que al inhibir este sistema trae como consecuencia una reducción del 90% de la producción de RNA viral, así como una caída en la producción de la progenie viral. Estos resultados sólo se observan cuando el sistema es inhibido a tiempos tempranos

de la infección y esto correlaciona con una disminución en el tamaño de los centros de replicación, así como una deslocalización en estos centros de la polimerasa viral VP1, lo cual explica la caída en la producción del RNA viral [99, 111]. Otra estrategia que se ha observado para regular la expresión temporal de las cadenas positivas y negativas del RNA viral es modulando la expresión de la polimerasa viral. En el caso de Turnip yellow mosaic virus cuando infecta a la célula, su polimerasa 66K es ubiquitinada y degradada vía proteasoma. Sin embargo, el reclutamiento de esta polimerasa a los centros de replicación en cloroplasto mediada por la proteasa viral, resulta en una acelerada desubiquitinación, promoviendo así su acumulación y producción del RNAg y subgenómico de polaridad positiva, necesarios para la síntesis de nuevas proteínas virales y del genoma que formarán parte de la progenie viral [112, 113]. De igual forma, se ha observado que HCV regula la producción de RNA a través de la degradación de su polimerasa NS5B mediado por hPLIC1, regulando así la abundancia de su RNA, de la polimerasa viral y evitando de igual forma su detección por el sistema inmune [84].

La tercera hipótesis que podría explicar el fenómeno observado se relaciona con las actividades antivirales que se disparan en la célula huésped de manera inmediata tras la entrada del virus. Una vez que el centro de replicación se forma y se empiezan a sintetizar las diferentes cadenas virales, el RNA genómico y subgenómico son exportados de estos centros para ser utilizados por la maquinaria de traducción celular y así sintetizar más proteínas virales, incluidas la cápside, necesaria para la morfogénesis del virus. Una de las estrategias que el virus podría disparar tras su entrada es mandar a degradar RNAsas celulares para que estas no reconozcan el RNA viral y así no sea degradado. Una posible RNAsa podría ser RNAsa L, la cual se ha reportado tiene efectos contra diferentes virus de RNA [114-116]. Cuando el proteasoma es inhibido, esta RNAsa ya no es degradada y puede actuar sobre los RNA virales que se exportan del centro de replicación y que ya no están protegidos, en este caso el RNA genómico y subgenómico, concordando el fenotipo observado en la disminución de sus abundancias comparado al antígeno que no se ve afectado ya que sigue protegido dentro del centro de replicación asociado a membranas.

En el futuro se requiere realizar estudios para determinar el mecanismo por el cual el UPS regula la replicación de Astrovirus y revelen un panorama más detallado de esta regulación,

ya que los resultados muestran que existe una fina regulación por el proteasoma sobre el virus, pero aun no sabemos los detalles de este mecanismo ni como es que el virus toma el control celular para su beneficio.

6. Conclusiones

1.- Inhibir el sistema UPS reduce la progenie y la síntesis de proteínas virales de astrovirus.

2.- El sistema UPS es necesario a tiempos tempranos de la infección y posteriores a la entrada.

3.- La actividad proteolítica del proteasoma es necesaria para la replicación de Astrovirus.

4.- Inhibir el proteasoma reduce las abundancias de los RNA de polaridad positiva, genómico y subgenómico.

5.- La disminución de los RNAs de polaridad positiva no se debe a una falla en la traducción inicial de las proteínas no estructurales virales, sino a un mecanismo aún más complejo que requiere ser estudiado con mayor detalle en el futuro.

6.- Los resultados anteriores indican por primera vez la relevancia del sistema UPS en la replicación viral para la familia Astroviridae e indican de manera contundente la necesidad de la actividad proteolítica durante la síntesis de los RNA virales.

7. Perspectivas.

Como una de las posibles explicaciones del efecto de MG132 en las abundancias de los RNAs virales es sobre la participación de RNAsas celulares en la estabilidad diferencial de estos RNAs. Para evaluar esta posibilidad podemos realizar un experimento de pulso y caza, marcando radiactivamente el RNA viral y cosechando a diferentes tiempos post infección bajo el tratamiento con MG132 y analizando la vida media del RNA viral. Si en presencia del inhibidor del proteasoma la vida media del RNA se reduce comparado al control sin la droga, sugeriría que una RNAsa estaría interviniendo en la estabilidad del RNA viral y apoyaría la teoría que la actividad proteolítica del proteasoma es necesaria para la degradación de dicha RNAsa.

En el caso que no se afecte la estabilidad del RNA viral en presencia de MG132, la reducción de los RNA de polaridad positiva podría deberse a un procesamiento diferencial de las proteínas virales en presencia del inhibidor del proteasoma. Para evaluarlo se podría analizar los diferentes intermediarios que se producen en presencia o ausencia de MG132 por Western blot usando los anticuerpos disponibles contra las diferentes regiones de la poli proteína viral.

Otra posibilidad sería evaluar las proteínas celulares que interaccionan con la polimerasa viral en presencia o ausencia de MG132 y que expliquen los fenómenos descritos en este estudio. Para llevarlo a cabo, se podrían evaluar dichas proteínas por ensayos de proteómica y seleccionar aquellas proteínas que son diferenciales comparadas al control sin el inhibidor del proteasoma. Posteriormente se podrían realizar ensayos de interferencia contra estas proteínas y evaluar la producción del RNA genómico y subgenómico en células infectadas.

En conjunto estos ensayos ayudarían a investigar y resolver de manera directa el posible mecanismo que ocurre durante la inhibición del proteasoma con MG132.

8. Referencias

1. Secretaria de Salud. *PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO Y ESTADÍSTICO DE LA MORTALIDAD POR CAUSAS SUJETAS A VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA EN MÉXICO, 2014*. 2017 04 abril 2017]; Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/267617/Mortalidad_2014.pdf.
2. Herrmann, J.E., et al., *Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children*. N Engl J Med, 1991. 324(25): p. 1757-60.
3. Matsui, S.M., *Astroviruses*. In B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman y S. E. Straus ed. *Virology*. Vol. 2. 2001, New York: Raven Press. 710-726.
4. Bosch, A., R.M. Pinto, and S. Guix, *Human astroviruses*. Clin Microbiol Rev, 2014. 27(4): p. 1048-74.
5. Johnson, C., et al., *Astrovirus Pathogenesis*. Viruses, 2017. 9(1).
6. Mitchell, D.K., et al., *Prevalence of antibodies to astrovirus types 1 and 3 in children and adolescents in Norfolk, Virginia*. Pediatr Infect Dis J, 1999. 18(3): p. 249-54.
7. Koopmans, M.P., et al., *Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands*. Clin Diagn Lab Immunol, 1998. 5(1): p. 33-7.
8. Brown, J.R., et al., *Astrovirus VA1/HMO-C: an increasingly recognized neurotropic pathogen in immunocompromised patients*. Clin Infect Dis, 2015. 60(6): p. 881-8.
9. Naccache, S.N., et al., *Diagnosis of neuroinvasive astrovirus infection in an immunocompromised adult with encephalitis by unbiased next-generation sequencing*. Clin Infect Dis, 2015. 60(6): p. 919-23.
10. Bouzalas, I.G., et al., *Neurotropic astrovirus in cattle with nonsuppurative encephalitis in Europe*. J Clin Microbiol, 2014. 52(9): p. 3318-24.
11. Selimovic-Hamza, S., et al., *Detection of Astrovirus in Historical Cases of European Sporadic Bovine Encephalitis, Switzerland 1958-1976*. Front Vet Sci, 2016. 3: p. 91.
12. Li, L., et al., *Divergent astrovirus associated with neurologic disease in cattle*. Emerg Infect Dis, 2013. 19(9): p. 1385-92.
13. Deiss, R., et al., *Neurologic Clinical Signs in Cattle With Astrovirus-Associated Encephalitis*. J Vet Intern Med, 2017. 31(4): p. 1209-1214.
14. Boros, A., et al., *Outbreaks of Neuroinvasive Astrovirus Associated with Encephalomyelitis, Weakness, and Paralysis among Weaned Pigs, Hungary*. Emerg Infect Dis, 2017. 23(12): p. 1982-1993.

15. Boujon, C.L., et al., *Indication of Cross-Species Transmission of Astrovirus Associated with Encephalitis in Sheep and Cattle*. *Emerg Infect Dis*, 2017. 23(9): p. 1604-1608.
16. Sebire, N.J., et al., *Pathology of astrovirus associated diarrhoea in a paediatric bone marrow transplant recipient*. *J Clin Pathol*, 2004. 57(9): p. 1001-3.
17. Midthun, K., et al., *Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California*. *J Clin Microbiol*, 1993. 31(4): p. 955-62.
18. Mendez, E., E. Salas-Ocampo, and C.F. Arias, *Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses*. *J Virol*, 2004. 78(16): p. 8601-8.
19. Taylor, M.B., et al., *Characterisation of a South African human astrovirus as type 8 by antigenic and genetic analyses*. *J Med Virol*, 2001. 64(3): p. 256-61.
20. Noel, J.S., et al., *Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing*. *J Clin Microbiol*, 1995. 33(4): p. 797-801.
21. Lee, T.W. and J.B. Kurtz, *Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-92, with evidence for two new serotypes*. *Epidemiol Infect*, 1994. 112(1): p. 187-93.
22. Guerrero, M.L., et al., *A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City*. *Pediatr Infect Dis J*, 1998. 17(8): p. 723-7.
23. Finkbeiner, S.R., C.D. Kirkwood, and D. Wang, *Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea*. *Virol J*, 2008. 5: p. 117.
24. Finkbeiner, S.R., et al., *Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses*. *Virol J*, 2009. 6: p. 161.
25. Finkbeiner, S.R., et al., *Detection of newly described astrovirus MLB1 in stool samples from children*. *Emerg Infect Dis*, 2009. 15(3): p. 441-4.
26. Finkbeiner, S.R., et al., *Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis*. *J Virol*, 2009. 83(20): p. 10836-9.
27. Kapoor, A., et al., *Multiple novel astrovirus species in human stool*. *J Gen Virol*, 2009. 90(Pt 12): p. 2965-72.
28. Mendez, E., *Astroviruses*. 5th ed. *In* B. N. Fields, D. N. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman y S. E. Straus ed. *Virology*. Vol. 2. 2007, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

29. Lewis, T.L., et al., *Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein*. J Virol, 1994. 68(1): p. 77-83.
30. Firth, A.E. and J.F. Atkins, *Candidates in Astroviruses, Seadornaviruses, Cytorhabdoviruses and Coronaviruses for +1 frame overlapping genes accessed by leaky scanning*. Virol J. 7: p. 17.
31. Fuentes, C., et al., *Identification of human astrovirus genome-linked protein (VPg) essential for virus infectivity*. J Virol. 86(18): p. 10070-8.
32. Lewis, T.L. and S.M. Matsui, *Astrovirus ribosomal frameshifting in an infection-transfection transient expression system*. J Virol, 1996. 70(5): p. 2869-75.
33. Geigenmuller, U., et al., *Processing of nonstructural protein 1a of human astrovirus*. J Virol, 2002. 76(4): p. 2003-8.
34. Gibson, C.A., et al., *Expression and processing of nonstructural proteins of the human astroviruses*. Adv Exp Med Biol, 1998. 440: p. 387-91.
35. Mendez, E., et al., *Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8*. J Virol, 2003. 77(21): p. 11378-84.
36. Jonassen, C.M., et al., *Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses*. Virus Res, 2003. 91(2): p. 195-201.
37. Al-Mutairy, B., et al., *Genome prediction of putative genome-linked viral protein (VPg) of astroviruses*. Virus Genes, 2005. 31(1): p. 21-30.
38. Kiang, D. and S.M. Matsui, *Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural protein*. J Gen Virol, 2002. 83(Pt 1): p. 25-34.
39. Guix, S., et al., *C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA*. J Virol, 2004. 78(24): p. 13627-36.
40. Gray, E.W., K.W. Angus, and D.R. Snodgrass, *Ultrastructure of the small intestine in astrovirus-infected lambs*. J Gen Virol, 1980. 49(1): p. 71-82.
41. Mendez, E., et al., *Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis*. J Virol, 2007. 81(19): p. 10649-58.
42. Herbert, T.P., I. Brierley, and T.D. Brown, *Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation*. J Gen Virol, 1997. 78 (Pt 5): p. 1033-40.
43. Wang, Q.H., et al., *Genetic analysis of the capsid region of astroviruses*. J Med Virol, 2001. 64(3): p. 245-55.

44. Geigenmuller, U., N.H. Ginzton, and S.M. Matsui, *Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells*. J Gen Virol, 2002. 83(Pt 7): p. 1691-5.
45. Krishna, N.K., *Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology*. Viral Immunol, 2005. 18(1): p. 17-26.
46. Dong, J., et al., *Crystal structure of the human astrovirus capsid spike*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(31): p. 12681-6.
47. Dryden, K.A., et al., *Immature and mature human astrovirus: structure, conformational changes, and similarities to hepatitis E virus*. J Mol Biol, 2012. 422(5): p. 650-8.
48. Banos-Lara Mdel, R. and E. Mendez, *Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism*. Virology, 2010. 401(2): p. 322-32.
49. Jang, S.Y., et al., *Detection of replicating negative-sense RNAs in CaCo-2 cells infected with human astrovirus*. Arch Virol. 155(9): p. 1383-9.
50. Fuentes, C., et al., *The C-terminal nsP1a protein of human astrovirus is a phosphoprotein that interacts with the viral polymerase*. J Virol. 85(9): p. 4470-9.
51. Murillo, A., et al., *Identification of Host Cell Factors Associated with Astrovirus Replication in Caco-2 Cells*. J Virol, 2015. 89(20): p. 10359-70.
52. Espinosa-Hernandez, W., et al., *PTB binds to the 3' untranslated region of the human astrovirus type 8: a possible role in viral replication*. PLoS One, 2014. 9(11): p. e113113.
53. Brinker, J.P., N.R. Blacklow, and J.E. Herrmann, *Human astrovirus isolation and propagation in multiple cell lines*. Arch Virol, 2000. 145(9): p. 1847-56.
54. Bass, D.M. and S. Qiu, *Proteolytic processing of the astrovirus capsid*. J Virol, 2000. 74(4): p. 1810-4.
55. Mendez, E., et al., *Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein*. J Virol, 2002. 76(16): p. 7996-8002.
56. Bass, D.M. and U. Upadhyayula, *Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes*. J Virol, 1997. 71(11): p. 8666-71.
57. Donelli, G., et al., *Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells*. J Med Virol, 1992. 38(4): p. 271-7.
58. Mendez, E., et al., *Characterization of human astrovirus cell entry*. J Virol, 2014. 88(5): p. 2452-60.

59. Daughenbaugh, K.F., et al., *The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment*. EMBO J, 2003. 22(11): p. 2852-9.
60. Finley, D., *Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome*. Annu Rev Biochem, 2009. 78: p. 477-513.
61. Coux, O., K. Tanaka, and A.L. Goldberg, *Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes*. Annu Rev Biochem, 1996. 65: p. 801-47.
62. Saeki, Y. and K. Tanaka, *Assembly and function of the proteasome*. Methods Mol Biol. 832: p. 315-37.
63. Huang, L. and C.H. Chen, *Proteasome regulators: activators and inhibitors*. Curr Med Chem, 2009. 16(8): p. 931-9.
64. Rechsteiner, M., *The 26S Proteasome*. Protein Science Encyclopedia, 2008: p. 220-247.
65. Tanaka, K. and M. Kasahara, *The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28*. Immunol Rev, 1998. 163: p. 161-76.
66. Noda, C., et al., *Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 277(2): p. 348-54.
67. Bogyo, M., et al., *Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the Escherichia coli homolog HslV by a new class of inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(13): p. 6629-34.
68. Deveraux, Q., et al., *A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates*. J Biol Chem, 1994. 269(10): p. 7059-61.
69. Rosenzweig, R., et al., *Rpn1 and Rpn2 coordinate ubiquitin processing factors at proteasome*. J Biol Chem. 287(18): p. 14659-71.
70. Lundgren, J., et al., *Use of RNA interference and complementation to study the function of the Drosophila and human 26S proteasome subunit S13*. Mol Cell Biol, 2003. 23(15): p. 5320-30.
71. Mannhaupt, G., et al., *Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast*. FEBS Lett, 1999. 450(1-2): p. 27-34.
72. Karpov, D.S., et al., *[Rpn4p is a positive and negative transcriptional regulator of the ubiquitin-proteasome system]*. Mol Biol (Mosk), 2008. 42(3): p. 518-25.
73. Tanaka, K., *Proteasomes: structure and biology*. J Biochem, 1998. 123(2): p. 195-204.

74. Kwon, Y.T. and A. Ciechanover, *The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy*. Trends Biochem Sci, 2017. 42(11): p. 873-886.
75. Patnaik, A., V. Chau, and J.W. Wills, *Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(24): p. 13069-74.
76. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields virology*. 5th ed. 2007, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 2 v. (xix, 3091, 86 p.).
77. Banerjee, R., et al., *Regulation of poliovirus 3C protease by the 2C polypeptide*. J Virol, 2004. 78(17): p. 9243-56.
78. Camborde, L., et al., *The ubiquitin-proteasome system regulates the accumulation of Turnip yellow mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase during viral infection*. Plant Cell. 22(9): p. 3142-52.
79. Kerkvliet, J., L. Papke, and M. Rodriguez, *Antiviral effects of a transgenic RNA-dependent RNA polymerase*. J Virol. 85(1): p. 621-5.
80. Jaag, H.M., J. Stork, and P.D. Nagy, *Host transcription factor Rpb11p affects tombusvirus replication and recombination via regulating the accumulation of viral replication proteins*. Virology, 2007. 368(2): p. 388-404.
81. Schwartz, M., et al., *Alternate, virus-induced membrane rearrangements support positive-strand RNA virus genome replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(31): p. 11263-8.
82. Kerkvliet, J., et al., *Transgenic expression of the 3D polymerase inhibits Theiler's virus infection and demyelination*. J Virol, 2009. 83(23): p. 12279-89.
83. de Groot, R.J., et al., *Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(20): p. 8967-71.
84. Gao, L., et al., *Interaction with a ubiquitin-like protein enhances the ubiquitination and degradation of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase*. J Virol, 2003. 77(7): p. 4149-59.
85. Losick, V.P., et al., *Signals in hepatitis A virus P3 region proteins recognized by the ubiquitin-mediated proteolytic system*. Virology, 2003. 309(2): p. 306-19.
86. Choi, A.G., et al., *The ubiquitin-proteasome system in positive-strand RNA virus infection*. Rev Med Virol, 2013. 23(2): p. 85-96.
87. Kikkert, M., et al., *Ubiquitination is essential for human cytomegalovirus US11-mediated dislocation of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum to the cytosol*. Biochem J, 2001. 358(Pt 2): p. 369-77.

88. Andrejeva, J., et al., *Degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2, respectively: consequences for virus replication in the presence of alpha/beta and gamma interferons.* J Virol, 2002. 76(5): p. 2159-67.
89. Peloponese, J.M., Jr., et al., *Ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax modulates its activity.* J Virol, 2004. 78(21): p. 11686-95.
90. Devireddy, L.R. and C.J. Jones, *Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release.* J Virol, 1999. 73(5): p. 3778-88.
91. Duan, L., et al., *The tumor suppressor protein p53 strongly alters human immunodeficiency virus type 1 replication.* J Virol, 1994. 68(7): p. 4302-13.
92. Tiemann, F. and W. Deppert, *Stabilization of the tumor suppressor p53 during cellular transformation by simian virus 40: influence of viral and cellular factors and biological consequences.* J Virol, 1994. 68(5): p. 2869-78.
93. Luo, H., et al., *Ubiquitin-dependent proteolysis of cyclin D1 is associated with coxsackievirus-induced cell growth arrest.* J Virol, 2003. 77(1): p. 1-9.
94. Ballut, L., et al., *Biochemical identification of proteasome-associated endonuclease activity in sunflower.* Biochim Biophys Acta, 2003. 1645(1): p. 30-9.
95. Sahana, N., et al., *Inhibition of the host proteasome facilitates papaya ringspot virus accumulation and proteasomal catalytic activity is modulated by viral factor HcPro.* PLoS One. 7(12): p. e52546.
96. Dielen, A.S., et al., *The 20S proteasome alpha5 subunit of Arabidopsis thaliana carries an RNase activity and interacts in planta with the lettuce mosaic potyvirus HcPro protein.* Mol Plant Pathol. 12(2): p. 137-50.
97. Mendez-Toss, M., et al., *Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome.* J Gen Virol, 2000. 81(Pt 12): p. 2891-7.
98. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
99. Lopez, T., et al., *Replication of the rotavirus genome requires an active ubiquitin-proteasome system.* J Virol, 2011. 85(22): p. 11964-71.
100. Marvin, S.A., et al., *Type I Interferon Response Limits Astrovirus Replication and Protects against Increased Barrier Permeability In Vitro and In Vivo.* J Virol, 2015. 90(4): p. 1988-96.
101. Neznanov, N., et al., *Different effect of proteasome inhibition on vesicular stomatitis virus and poliovirus replication.* PLoS One, 2008. 3(4): p. e1887.

102. Jiang, H.Y. and R.C. Wek, *Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2alpha) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition*. J Biol Chem, 2005. 280(14): p. 14189-202.
103. Jariel-Encontre, I., G. Bossis, and M. Piechaczyk, *Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1786(2): p. 153-77.
104. Kapuria, V., et al., *Protein cross-linking as a novel mechanism of action of a ubiquitin-activating enzyme inhibitor with anti-tumor activity*. Biochem Pharmacol, 2011. 82(4): p. 341-9.
105. Oh, C., et al., *Downregulation of ubiquitin level via knockdown of polyubiquitin gene Ubb as potential cancer therapeutic intervention*. Sci Rep, 2013. 3: p. 2623.
106. Bauckman, K.A., N. Owusu-Boaitey, and I.U. Mysorekar, *Selective autophagy: xenophagy*. Methods, 2015. 75: p. 120-7.
107. Guix, S., et al., *Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells*. Virology, 2004. 319(2): p. 249-61.
108. Marvin, S.A., et al., *Type I Interferon Response Limits Astrovirus Replication and Protects against Increased Barrier Permeability In Vitro and In Vivo*. J Virol, 2016. 90(4): p. 1988-96.
109. Monroe, S.S., et al., *Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells*. J Virol, 1991. 65(2): p. 641-8.
110. Wang, X., et al., *Intersection of the multivesicular body pathway and lipid homeostasis in RNA replication by a positive-strand RNA virus*. J Virol, 2011. 85(11): p. 5494-503.
111. Contin, R., et al., *Rotavirus replication requires a functional proteasome for effective assembly of viroplasm*s. J Virol, 2011. 85(6): p. 2781-92.
112. Chenon, M., et al., *A viral deubiquitylating enzyme targets viral RNA-dependent RNA polymerase and affects viral infectivity*. EMBO J, 2012. 31(3): p. 741-53.
113. Camborde, L., et al., *The ubiquitin-proteasome system regulates the accumulation of Turnip yellow mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase during viral infection*. Plant Cell, 2010. 22(9): p. 3142-52.
114. Thornbrough, J.M., et al., *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus NS4b Protein Inhibits Host RNase L Activation*. MBio, 2016. 7(2).
115. Fagone, P., et al., *Induction of OAS gene family in HIV monocyte infected patients with high and low viral load*. Antiviral Res, 2016. 131: p. 66-73.

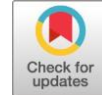
116. Sanchez-Tacuba, L., et al., *Rotavirus Controls Activation of the 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase/RNase L Pathway Using at Least Two Distinct Mechanisms*. J Virol, 2015. 89(23): p. 12145-53.

Apéndice I

Artículo 1: The ubiquitin-proteasome system is necessary for the efficient replication of human astrovirus.



VIRUS-CELL INTERACTIONS



The Ubiquitin-Proteasome System Is Necessary for Efficient Replication of Human Astrovirus

Luis A. Casorla-Pérez,^a Tomás López,^a Susana López,^a  Carlos F. Arias^a

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

ABSTRACT Astroviruses, members of the family *Astroviridae*, represent an important cause of human gastroenteritis in the world. The cellular factors required for astrovirus replication have been poorly studied. In this work, we evaluated the relevance of the ubiquitin-proteasome system (UPS) in the replication of Yuc8, a human astrovirus serotype 8 strain. We found that proteasome inhibitors decrease the production of infectious viral progeny at a step in the replication cycle subsequent to virus entry. The inhibition of proteasome activity decreases viral RNA levels and viral protein synthesis; similarly, the inhibition of ubiquitination by chemical inhibitors or RNA interference (RNAi) reduces the production of viral progeny as well as viral protein synthesis. The effect on viral progeny production induced by proteasome inhibitors is not explained by a reduction in the pool of monoubiquitin or the induction of early apoptosis or autophagy. Our observations are consistent with the need of the proteolytic activity of the UPS for the efficient replication of the virus and suggest that UPS is necessary for the production of genomic and subgenomic RNA but not for antigenomic RNA.

IMPORTANCE Astroviruses are a major cause of gastroenteritis in young humans and animals, and recently, it was associated with fatal encephalitis in humans. The role of the ubiquitin-proteasome system in the replication of these viruses has not been studied previously. In this work, we present evidence that supports that the proteolytic activity of the proteasome is necessary for efficient viral progeny production and that this proteolytic system is required for the accumulation of both genomic and subgenomic viral RNAs.

KEYWORDS RNA replication, astrovirus, proteasome, viral replication

Astroviruses are nonenveloped, single-stranded, positive RNA viruses grouped into the family *Astroviridae*. Human astroviruses (HAstVs) are grouped into three clades, one comprising the classical HAstVs (8 serotypes), and the so-called novel astroviruses that include two clades, MLB and VA (1). HAstVs cause acute gastroenteritis and are associated with 2 to 9% of acute, nonbacterial diarrheal cases in children (2) and were recently associated with neurological disorders in immunocompromised individuals (3, 4).

The genome of HAstV is formed by one single-stranded, polyadenylated RNA molecule of approximately 6.8 kb. The 5' end of the genomic RNA (gRNA) is covalently attached to a VPg protein that is required for efficient viral infection (5). The genome harbors three open reading frames (ORFs). ORF1a and ORF1b encode the nonstructural proteins, while ORF2 codes for the structural polyprotein (6). HAstV-8 enters the cell by a clathrin-dependent mechanism, and after reaching the cytoplasm, the gRNA of the incoming viral particle directs the synthesis of two polyprotein precursors, NSP1a and NSP1ab (7). The polyprotein precursors are processed by viral and cellular proteases to generate several protein products. The NSP1a precursor yields the viral protease and

VPg as well as other not-well-characterized proteins. NSP1ab yields the same proteins but also the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) encoded in ORF1b. The incoming gRNA is used as the template by RdRp to synthesize the antigenomic RNA (agRNA), which in turn serves as the template for the production of two kinds of positive-stranded RNAs, the gRNA and the subgenomic RNA (sgRNA) (6). The synthesized gRNA is used as mRNA to produce more nonstructural proteins, and it is also packed as the viral genome of the newly assembled viral particles (2). The sgRNA is used as mRNA for the production of the capsid polyprotein VP90. The replication and morphogenesis of the viral particles are associated with membranes (8, 9). The viral particles are released by a nonlytic mechanism that requires processing by cellular caspases of the full-length capsid polyprotein VP90 to yield VP70 (10, 11). VP70 in the extracellular viruses is then processed by trypsin into the final three capsid proteins that constitute the mature, infectious virus.

The ubiquitin-proteasome system (UPS) is the major degradation system in the cell. Major roles of this system consist of the degradation of misfolded/damaged proteins (12, 13) and the regulation of the level of proteins related to the control of cell cycle progression, protein trafficking, transcription, the immune response, and signal transduction (14, 15). The UPS is formed by two major components: the first is the proteasome, a multiprotein complex that degrades proteins, and the second component is ubiquitin, a highly conserved protein of 76 amino acids that is covalently attached to target proteins through a three-step reaction, known as ubiquitination. Protein ubiquitination is a posttranslational modification involved in several cellular functions; one of them is the delivery of the ubiquitin-tagged proteins to the proteasome for degradation. Depending on the nature of ubiquitination, this modification can modify other aspects of protein function independently of protein degradation, such as protein-protein interactions (16) and sorting of transmembrane proteins (17). The proteasome is formed by two components, a proteolytic core particle, the

Received 18 October 2017 Accepted 18 October 2017

Accepted manuscript posted online 1 November 2017

Citation Casorla-Pérez LA, López T, López S, Arias CF. 2018. The ubiquitin-proteasome system is necessary for efficient replication of human astrovirus. *J Virol* 92:e01809-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01809-17>.

Editor Stacey Schultz-Cherry, St. Jude Children's Research Hospital

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Tomás López, tdlopez@ibt.unam.mx.

20S (720kDa) proteasome, sandwiched between two 19S (890-kDa) “cap” regulatory complexes. The two components form the 26S proteasome, which is specialized in the degradation of ubiquitinated proteins. Versions of the proteasome, with caps other than 19S (for example, members of the activator families 11S and Blm10), can degrade nonubiquitinated proteins (14, 18).

As the UPS has a vital role in many fundamental cellular processes, many viruses have reprogrammed this machinery according to their needs. The interactions between viruses and the UPS are complex; one of the more common features is the use of the UPS to control the level of antiviral factors and to regulate innate antiviral signaling (19). In the case of viruses that depend on the cell cycle, this system is used to control the level of proteins that regulate cell cycle progression, a feature observed frequently in DNA virus infections (20). It has been reported that the UPS regulates the replication of several viruses, including rotavirus (21, 22), West Nile virus (23), circovirus (24), human hepatitis E virus (25), human immunodeficiency virus, influenza virus (26), vaccinia virus, and adenovirus (20). In the above-mentioned examples, the inhibition of the UPS had a negative impact on viral replication, but in other cases, the inhibition of the UPS favors virus replication, as in the case of papaya ringspot virus (27), or the enhancement of adeno-associated virus transduction (28). Here, we report that the function of this system is required for the efficient replication of HAstV, most likely for the synthesis of viral gRNA and sgRNA.

RESULTS

Proteasome inhibitors reduce the production of astrovirus progeny.

To determine if the proteolytic activity of the proteasome is required for HAstV replication, the effect of a set of proteasome inhibitors on the production of viral progeny was evaluated. For this, C2Bbe1 cells (29) were infected with Yuc8, a serotype 8 HAstV strain, and at the end of the adsorption period, the cells were washed and the indicated concentrations of drugs were added. The cells were then collected at 18 h postinfection (hpi), and the viral titers were evaluated by an immunoperoxidase focus-forming assay

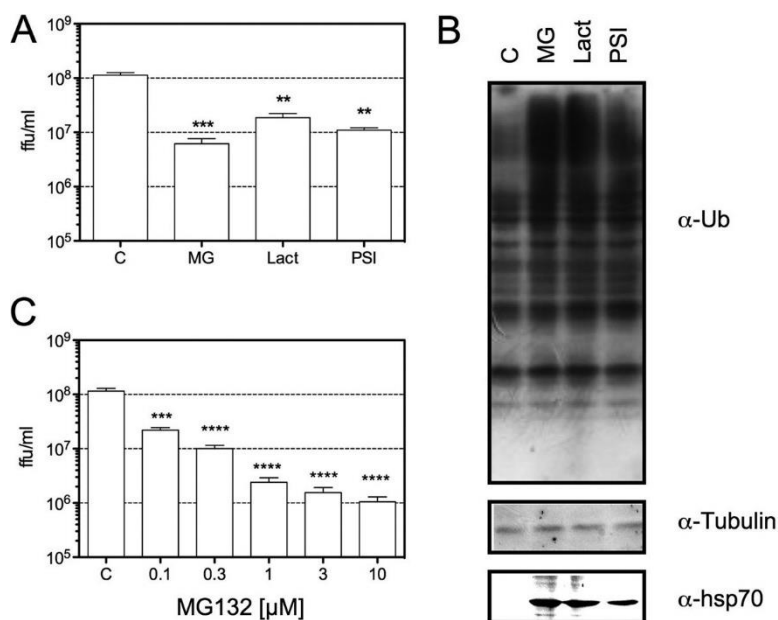


FIG 1 Proteasome inhibitors reduce the production of viral progeny. C2Bbe1 cells were infected with HAstV Yuc8 at an MOI of 3. At the end of the adsorption period, the cells were washed, and drugs were added at the concentrations described below. At 18 hpi, cell cultures were collected and analyzed. (A) The cells and media were collected together, and the viral titer was determined by a peroxidase focus-forming assay, as described in Materials and Methods. The data are expressed as focus-forming units (ffu) per milliliter and represent the arithmetic means \pm standard errors of the means of results from three independent experiments performed in triplicate. The concentrations used were 1 M MG132, 10 M lactacystin, and 20 M PSI. ***, $P < 0.0007$; **, $P < 0.0022$. (B) Yuc8-infected C2Bbe1 cells were incubated for 18 h with 1 M MG132 (MG), 10 M lactacystin (Lact), 20 M PSI, or dimethyl sulfoxide (DMSO) (control [C]). Total proteins were collected in Laemmli buffer, resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and incubated with the indicated antibodies. Ub, ubiquitin. (C) Infected cells were incubated with the indicated concentrations of MG132, and the production of viral progeny was determined as described above. The data are expressed as focus-forming units per milliliter and represent the arithmetic means \pm standard errors of the means of results from four independent experiments performed in duplicate. ***, $P < 0.0007$; ****, $P < 0.0002$.

(Fig. 1A). The efficiency of drugs used was confirmed by Western blotting (Fig. 1B). As expected, proteasomal inhibitors caused an accumulation of ubiquitinated proteins and increased the expression of hsp70 (30–32). Since MG132 was the most efficient inhibitor, reducing the yield of viral progeny by more than 10-fold, its effect on virus replication was further characterized, and the dose-effect of this compound on viral replication was determined (Fig. 1C). The production of viral progeny was inhibited by MG132 in a dose-response manner with a 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of 26 nM. To discard the possibility that the reduction of the virus yield was due to toxicity produced by MG132, cell viability was evaluated by using a lactate dehydrogenase (LDH) release assay; at the doses and times tested, MG132 was not toxic for infected or mock-infected cells (data not shown).

MG132 interferes with an early step during the HAstV replication cycle. To define the step at which MG132 affects the replication cycle of

HAsTV, the effect of the addition of the drug at different times postadsorption on the production of viral progeny was determined. As shown in Fig. 2A, the drug inhibited the yield of viral progeny by more than 1 logarithm when added at the end of the adsorption period (time zero) or at 4 h postadsorption (hpa), while its effect was significantly reduced when MG132 was added at 8 hpa and later on. Furthermore, when MG132 was added 3 h before and during the adsorption period (4to0 in Fig. 2A) and removed after this 4-h incubation time, viral progeny production was not affected. Taken together, these results suggest that virus entry is not affected by proteasome inhibition but that a relatively early step during viral replication requires an active proteasome.

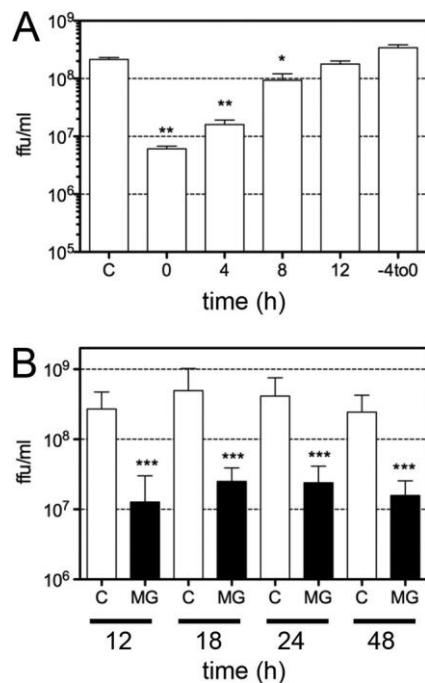


FIG 2 The proteasome inhibitor MG132 affects an early step of HAsTV replication. C2Bbe1 cells were infected with HAsTV Yuc8 at an MOI of 3, and 1 M MG132 was added at the indicated times during infection. Viral progeny production was evaluated as described in Materials and Methods. (A) MG132 was not added (C) or was added at the indicated times postadsorption, and at 18 hpi, the cells and medium were collected together, and the amount of infectious viral particles was quantitated. “4to0” indicates that MG132 was present for a period of only 4 h (3 h before adsorption and during the 1-h adsorption period), and after this time, the drug was washed away. Data are expressed as focus-forming units per milliliter and represent the arithmetic means standard errors of the means of results from three independent experiments performed in duplicate. **, P 0.0040; *, P 0.0162. (B) C2Bbe1 cells were infected with HAsTV Yuc8 at an MOI of 3. At the end of the adsorption period, the cells were washed, 1 M MG132 was added, the cells and media were collected together at the indicated times, and the viral titer was determined by a focus-forming assay, as described in Materials and Methods. The data are expressed as focus-forming units per milliliter and represent the arithmetic means standard errors of the means of results from three independent experiments performed in triplicate. ***, P 0.0007. Open bars are control, dimethyl sulfoxide-treated cells (C), and closed bars are MG132 (MG)-treated cells.

It has been reported that MG132 can differentially affect the replication of viruses; for example, proteasome inhibitors block the replication of vesicular stomatitis virus (VSV) but only delay poliovirus growth (33). To determine its effect on astrovirus replication, we evaluated the viral progeny produced from 12 to 48 hpi in cells in which MG132 was maintained in the medium during then entire incubation period; the production of infectious virus was inhibited at similar levels at all times tested (Fig. 2B), suggesting that the replication of the virus was blocked and not delayed by MG132 treatment.

Proteasome inhibition blocks the synthesis of viral proteins. As mentioned above, the synthesis of the capsid polyprotein precursor is directed by the sgRNA, while the nonstructural proteins are synthesized from the gRNA. In order to evaluate the effect of proteasome inhibition on the accumulation of viral proteins, C2Bbe1 cells were treated with 1 M MG132 and analyzed by Western blotting. As shown in Fig. 3A and B, the accumulation of both the capsid and the protease decreased by 80 and 60%, respectively, suggesting that the activity of the proteasome is required for the synthesis of proteins derived from both gRNA and sgRNA. On the other hand, it was previously reported that MG132 can induce an arrest in cell translation (22, 33, 34); thus, to determine if this was the case in C2Bbe1 cells, the incorporation of [³⁵S]Met into cellular proteins in the presence of increasing concentrations of MG132 was evaluated. As shown in Fig. 3C and D, MG132 did not significantly affect the synthesis of cellular

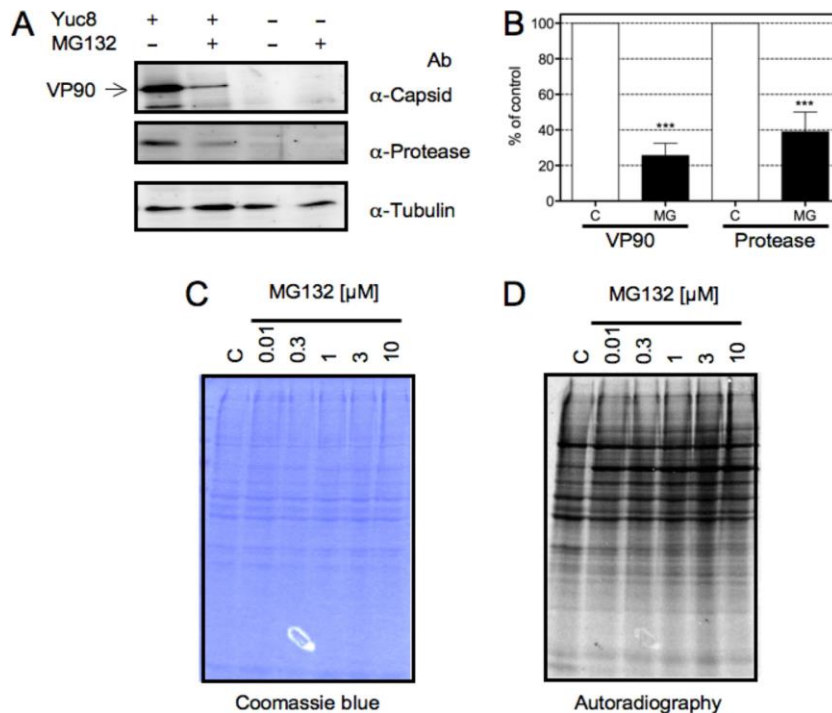


FIG 3 Expression of viral proteins is inhibited by MG132. C2Bbe1 cells were infected with HAstV Yuc8 at an MOI of 3, and at the end of the adsorption period, MG132 was added at the indicated concentrations. The proteins were metabolically labeled with [³⁵S]methionine-cysteine for 1 h at 17 hpi, the cells were harvested at 18 hpi in Laemmli sample buffer, and the proteins were resolved by SDS-PAGE. (A) Western blot analysis of the indicated proteins from infected or mock-infected cells in the presence or absence of 1 M MG132. Ab, antibody. (B) Quantitation of the normalized level of expression of the

indicated viral protein from infected dimethyl sulfoxide (C)- or MG132 (MG)-treated cells using tubulin as a loading control. Data are expressed as a percentage of the value for control (infected, dimethyl sulfoxide-treated) cells and represent the means ± standard errors of the means of results from five independent experiments. ***, $P < 0.001$. (C) Coomassie blue staining of the gel in panel D. (D) Autoradiography of metabolically labeled cellular proteins in the presence of the indicated concentrations of MG132.

proteins under the conditions used, suggesting that the drug specifically inhibits protein synthesis from both positive-stranded viral RNAs.

Ubiquitination is required for HAstV replication. The proteasome degrades ubiquitinated proteins, but several proteasome substrates can be degraded in a ubiquitin-independent way (14). If the activity of the proteasome during HAstV replication depends on ubiquitination, it is expected that the inhibition of ubiquitination will affect the replication of HAstV. To evaluate this possibility, the effect of Pyr-41, an inhibitor of the E1 ubiquitin-activating enzyme, on the generation of viral progeny and viral protein synthesis was tested. In the presence of this inhibitor, *de novo* ubiquitination does not occur (35). Figure 4A shows that treatment of the cells with Pyr-41 reduced the viral progeny titer in a dose-response manner, with an IC_{50} of 24 M. At the doses and under the conditions tested, this drug was not toxic to the cells, as judged by an LDH assay (data not shown). The efficiency of Pyr-41 was confirmed by Western blotting in which ubiquitinated proteins and the accumulation of hsp70 were detected (Fig. 4B), since it has been reported that Pyr-41 causes an accumulation of ubiquitinated proteins and an increase in the expression of hsp70 (36). As in the case of MG132, the syntheses of the capsid protein and the viral protease were reduced by about 80% in Pyr-41-treated cells (Fig. 4C and D).

As an alternative approach to evaluate the role of ubiquitination in HAstV replication, the expression of the *ubc* gene, one of the four genes that encode ubiquitin (37), was silenced by RNA interference. A small interfering RNA (siRNA) pool directed against *ubc* was transfected into cells, and viral replication was evaluated. When the viral progeny produced in control and ubiquitin-silenced cells were compared, a reduction

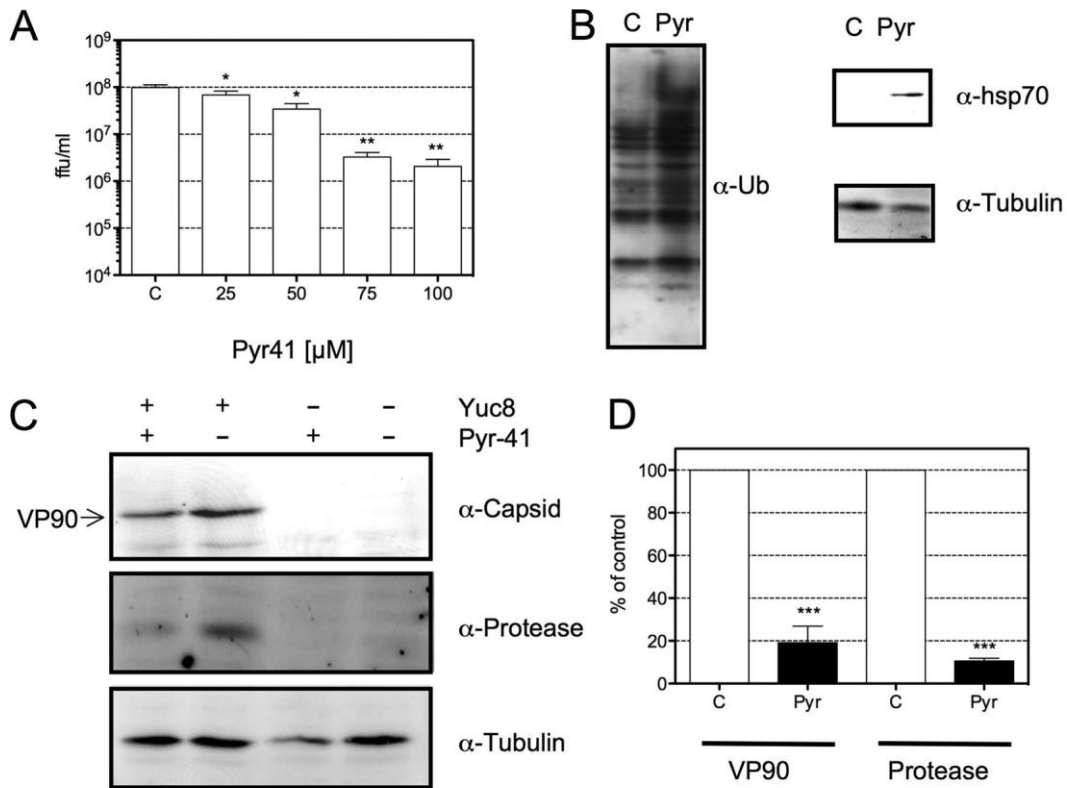


FIG 4 Pyr-41, an inhibitor of E1-activating enzymes, reduces viral progeny production and the synthesis of viral proteins. C2Bbe1 cells were infected with HAstV Yuc8 at an MOI of 3. At the end of the adsorption period, Pyr-41 was added at the indicated concentrations, and cells were then processed at 18 hpi. (A) Cells and medium were collected together, and the titer of the viral progeny produced was evaluated. The data are expressed as focus-forming units per milliliter and represent the means standard errors of the means. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. (B) Yuc8-infected C2Bbe1 cells were incubated for 18 h with 100 M Pyr-41 (Pyr) or dimethyl sulfoxide (C). Total proteins collected in Laemmli buffer were resolved by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes for detection of the indicated proteins. (C) Western blot analysis of the indicated proteins from infected or mock-infected cells in the presence or absence of 100 M Pyr-41. The proteins were collected in Laemmli sample buffer, resolved by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane, and stained with the indicated antibodies. Immunodetection was performed by using Alexa 647-conjugated secondary antibodies. (D) Quantification of normalized values (using tubulin as a loading control) of expression for the indicated viral proteins in infected dimethyl sulfoxide (C)- or Pyr-41-treated cells. Data are expressed as a percentage of values for the control (dimethyl sulfoxide-treated cells) and represent the means standard errors of the means of results from five independent experiments. ***, $P < 0.001$.

of more than 95% was observed, a level similar to that obtained when cells were treated with MG132 or Pyr-41 (Fig. 1A and 4A). Under these conditions, the synthesis of the viral protease and the capsid was also noticeably reduced (Fig. 5B and C). The efficiency of interference was evaluated by Western blotting (Fig. 5D). Under these conditions, a reduction of more than 95% in the accumulation of ubiquitin was observed, as judged by the level of monoubiquitin molecules detected, i.e., the pool of free ubiquitin plus the ubiquitin associated with E1 and E2 enzymes. The reduction in the amount of ubiquitin was not toxic to the cells, as judged by an LDH release assay (data not shown), nor did it affect the synthesis of cellular proteins (Fig. 5D). Taken together, these results suggest that ubiquitination is necessary for the efficient replication of HAstV.

When cells are incubated with proteasome inhibitors for long periods of time, ubiquitin is not recycled, and it has been shown that the pool of ubiquitin available for ubiquitination can be reduced (22, 38). Under these conditions, proteasome inhibitors could affect viral replication not by a direct effect on proteolysis but by an indirect effect on the ubiquitination of proteins required for viral replication. To explore this possibility, the level of monoubiquitin in control and MG132-treated cells was evalu-

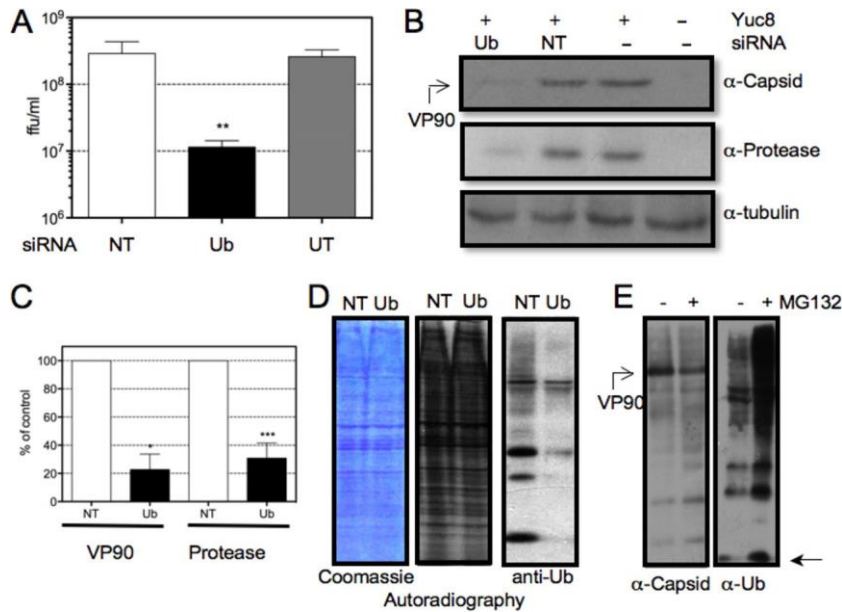


FIG 5 Interference of ubiquitin (Ub) synthesis reduces the amount of viral progeny produced and viral protein synthesis. C2Bbe1 cells were transfected with either an siRNA directed to the *ubc* gene or an irrelevant control (NT) or were untransfected (UT), and at 48 h posttransfection, cells were infected with HAsV Yuc8 at an MOI of 3. (A) Cells and media were collected together at 18 hpi, and the viral titer was determined by a peroxidase focus-forming assay, as described in Materials and Methods. Data are expressed as focus-forming units per milliliter and represent the arithmetic means standard errors of the means of results from three independent experiments performed in duplicate. **, P 0.004. (B) Proteins collected at 18 hpi in Laemmli sample buffer were resolved by SDS-PAGE and processed for immunodetection using the indicated antibodies. (C) Quantification of the normalized value (using tubulin as a loading control) of expression of the indicated viral proteins of infected cells transfected with an siRNA with no target in the human genome (NT) or ubiquitin-targeting siRNA. Data are expressed as a percentage of the value for control cells (transfected with NT siRNA) and represent the means standard errors of the means of results from three independent experiments. *, P 0.02; ***, P 0.001. (D) Cells transfected with the indicated siRNAs were metabolically labeled with [³⁵S]methionine-cysteine for 1 h at 17 hpi and then collected in Laemmli sample buffer and resolved by SDS-PAGE. Data from Coomassie blue staining, autoradiography, and immunodetection of ubiquitin (anti-Ub) are shown. In order to detect monoubiquitin, the proteins were resolved on Tris-Tricine gels. (E) Incubation of cells with MG132 does not decrease the pool of monoubiquitin. C2Bbe1 cells were infected with HAsV Yuc8 at an MOI of 3. At the end of the adsorption period, 1 M MG132 was added or not, and the cells were incubated for 18 h at 37°C, lysed in Laemmli sample buffer, and resolved in Tris-Tricine gels for immunodetection of viral capsid or ubiquitin by Western blotting. The position of the migration of monoubiquitin is indicated with an arrow.

ated by Western blotting. In MG132-treated cells, the pool of monoubiquitin was not reduced but instead was augmented, and, as

expected, the level of ubiquitinated proteins was increased (Fig. 5E). These data suggest that the effect of proteasome inhibitors on HAstV replication is more likely due to the proteolytic component of the UPS. However, the possibility that the ubiquitination of proteins, not related to proteolysis, could be necessary for virus replication cannot be ruled out.

The reduction in the amount of viral progeny caused by proteasome inhibition is not related to the induction of autophagy or apoptosis. Long exposure of cells to proteasomal inhibitors can induce apoptosis or autophagy, and autophagy proteins can target viral components or virions for lysosomal degradation, a process termed xenophagy (39). In addition, HAstV infection induces apoptosis, an event related to virus release (10, 11, 40), but at early times during infection, apoptosis could reduce viral production. To evaluate if the reduction in the amount of viral progeny observed in the presence of MG132 was a consequence of the induction of apoptosis or autophagy, the effects of bafilomycin, an inhibitor of the vacuolar proton ATPase, and of carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[*O*-methyl]-fluoromethylketone (Z-VAD-fmk), a caspase inhibitor, on the virus yield were evaluated. If autophagy or apoptosis was responsible for the inhibition of viral replication induced by MG132, it would be

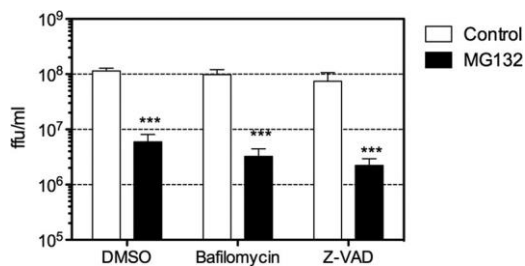


FIG 6 The decrease in the amount of viral progeny caused by MG132 is not related to the induction of autophagy or apoptosis. Cells were infected with Yuc8 at an MOI of 3, and at the end of the adsorption period, the indicated drugs were added. At 20 hpi, the cells were collected and lysed by three freeze-thaw cycles, and the viral titer was determined by a focus-forming assay, as described in Materials and Methods. The data are expressed as focus-forming units per milliliter and represent the arithmetic means standard errors of the means of data from three independent experiments performed in duplicate. ***, $P < 0.0007$. Drug concentrations used were 1 M MG132, 50 nM bafilomycin, and 50 M Z-VAD.

expected that these drugs would revert the inhibition observed. As shown in Fig. 6, neither bafilomycin nor Z-VAD-fmk reversed the reduction in the amount of viral progeny. The drugs were confirmed to efficiently exert their actions by evaluation of the effect of bafilomycin on the infectivity of HAstV and of Z-VAD-fmk on the processing of the capsid protein, as reported previously (7, 10, 11) (data not shown). These results support the conclusion that proteasomal activity is required for HAstV replication.

The proteasome inhibitor MG132 reduces the production of genomic and subgenomic RNAs. The reduction in the synthesis of viral proteins observed in the presence of MG132 could be due to an effect on the efficiency of translation of viral gRNA and sgRNA or to a reduction in the level of these RNAs, with the consequent reduction of viral protein synthesis. To discern between these two alternatives, we evaluated the levels of gRNA and agRNAs in control and MG132-treated cells by real-time

reverse transcription-quantitative PCR (qRT-PCR). As shown in Fig. 7, the level of gRNA was reduced to about 10% in MG132-treated cells at 12 hpi, and it was increased to about 28% at 24 hpi, with respect to the levels of gRNA observed in mock-treated control cells. In contrast, the level of agRNA did not change at 12 hpi and was reduced by only about 60% at 24 hpi. The reduction in the amount of agRNA observed at 24 hpi could be explained given that the template for its synthesis, the gRNA, appears to be diminished at 12 hpi, and a drop in the gRNA level will eventually result in decreased agRNA synthesis. These data suggest that the step inhibited by

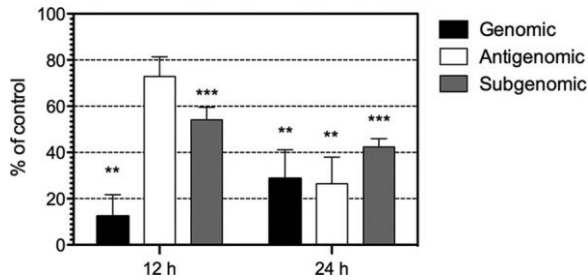


FIG 7 MG132 reduces the amount of viral RNAs. C2Bbe1 cells were infected with HAstV Yuc8 at an MOI of 3. At the end of the adsorption period, 1 M MG132 or dimethyl sulfoxide was added, the cells were incubated for the indicated periods of time, and total RNA was isolated. The levels of genomic, antigenomic, and subgenomic (ORF2) RNAs were determined by a qRT-PCR assay, as described in Materials and Methods. Data are expressed as a percentage of the value for dimethyl sulfoxide-treated cells as a control, which was taken as 100%, and represent the means ± standard errors of the means of data from three (genomic and antigenomic) or five (subgenomic) independent experiments. *, $P < 0.05$.

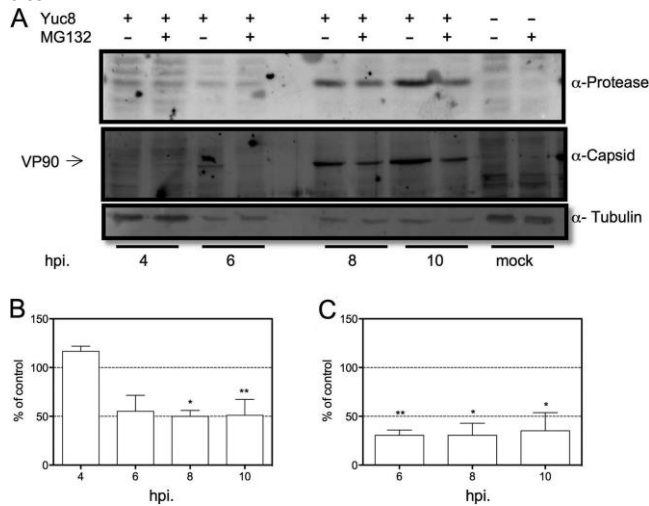


FIG 8 The level of expression of the viral protease is not reduced by MG132 at early times of infection. C2Bbe1 cells were infected with HAstV Yuc8 at an MOI of 50. At the end of the adsorption period, 1 M MG132 or dimethyl sulfoxide was added, the cells were incubated for the indicated periods of time, and cells were then collected in Laemmli sample buffer and resolved by SDS-PAGE. (A) Representative Western blot analyses using the indicated antibodies and controls of uninfected cells (MG132 or dimethyl sulfoxide treated) are included. (B and C) Densitometric analysis of Western blots. Graphs show the normalized values (using tubulin as a loading control) of expression of the viral protease (B) and the capsid protein (C) compared to control (dimethyl sulfoxide-treated) cells. Data are expressed as a percentage of values for the control (nontreated cells) and represent

the means ± standard errors of the means of results from three independent experiments.
*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

MG132 could be the production of gRNA and, as a consequence, the level of agRNA at late times during infection.

Since the synthesis of the capsid protein was reduced by MG132 (Fig. 3A and B), it is possible that, as observed for the gRNA, the level of sgRNA could also be affected in MG132-treated cells. To evaluate the level of sgRNA, we performed qRT-PCR using primers designed to amplify the ORF2 region of the two positive-stranded viral RNAs, as opposed to the primers designed to measure the level of gRNA, which amplify a region located in ORF1b. As shown in Fig. 7, the level of RNA detected was reduced by about 50% at both 12 and 24 hpi in MG132-treated cells. Given that the sequence of ORF2 is present in both the sgRNA and the gRNA, it is not possible to differentiate between the two RNAs by qRT-PCR. However, based on the differences between the threshold cycle (C_T) values for the amplification of the ORF1b (gRNA) and the ORF2 (gRNA plus sgRNA) regions, we determined that the quantity of sgRNA represents about 90% of the RNA evaluated with the ORF2 primers. Thus, this indicates that the level of the ORF2 region detected by qRT-PCR represents mostly the level of sgRNA.

The inhibition of the proteasome does not affect the expression of the viral protease at early times postinfection. The data presented above suggest that the production of positive-sense RNAs but not of negative-sense RNAs is inhibited by MG132. In this regard, it is important to take into consideration that the first round of nonstructural viral protein synthesis is directed by the incoming genomic RNA present in the original viral particle that infected the cell. Thus, one prediction from our data is that at early times of infection, the level of expression of nonstructural proteins (produced by the translation of the original gRNA) is not affected by drug treatment. To evaluate this hypothesis, we used a multiplicity of infection (MOI) of 50 to infect C2Bbe1 cells and detected the level of viral protease at 4, 6, 8, and 10 hpi. Although difficult to detect due to the small amount of viral protein produced, at 4 hpi, the level of viral protease was not observed to be reduced by MG132, while a reduction in its accumulation was found at later times (Fig. 8A and B). These results suggest that the reduction in the synthesis of gRNA and sgRNA observed in the presence of MG132 is not related, at least at early times of infection, to a failure in the production of the viral nonstructural proteins, including the RdRp. Furthermore, the abundance of the VP90 structural protein, which is translated from the sgRNA, is reduced from the initial time when it can be detected, at 6 hpi (Fig. 8A and C). Altogether, these data suggest that the inhibition of the proteasome activity does not affect directly the translation of viral mRNAs but one step related to the accumulation of the viral positive-sense RNAs.

DISCUSSION

The proteasome is the major protein degradative system in the cytoplasm. In this work, we show that proteasomal inhibitors and the inhibition of cellular ubiquitination result in the reduction of the production of astroviral progeny. Inhibition of proteasomal activity may

lead to a reduction in the pool of free ubiquitin, which in turn may affect the *de novo* ubiquitination of proteins. For instance, long exposures of QT6 cells to MG132 reduced the cell egress of the retrovirus respiratory syncytial virus (RSV) by decreasing the pool of ubiquitin available for ubiquitination, which is required for virus budding (38). In our case, the fact that the pool of monoubiquitin was not decreased in the presence of MG132 (Fig. 5E) strongly suggests that the proteolytic activity of the proteasome is necessary for HAstV replication. This conclusion is supported by the fact that three different proteasomal inhibitors (MG132, lactacystin, and *N*-[(phenylmethoxy)carbonyl]-L-isoleucyl-L-glutamyl-*tert*-butyl ester-*N*-[(1S)-1-formyl-3-methylbutyl]-L-alaninamide [PSI]), with different mechanisms of action (41–43), reduced the production of viral progeny. Thus, the effect of Pyr-41 and the ubiquitin siRNA on virus replication could be explained because protein ubiquitination is important for protein degradation, although a role of ubiquitination in the replication cycle of the virus, independent of protein degradation, cannot be discarded. Preliminary results in our laboratory suggest that the replication of other classical astroviruses is affected in a manner similar to that of Yuc8.

Exposure of cells to proteasome inhibitors can induce autophagy or apoptosis (44–46). As these mechanisms could have antiviral effects, one possibility is that MG132 reduces HAstV replication by an indirect mechanism, inducing the degradation of viral components by autophagy or by early cell death. However, the fact that the effect of MG132 was not relieved by treatment with autophagy or apoptosis inhibitors suggests that these processes are not involved in the reduction of HAstV progeny production caused by MG132 (Fig. 6).

The replication cycle of HAstV begins with the translation of the incoming viral gRNA that directs the synthesis of the viral nonstructural proteins, followed by the formation of a polymerase complex that copies the gRNA into an agRNA. The agRNA is then used as the template for the synthesis of additional gRNA molecules and of sgRNA, which encodes the viral capsid polyprotein (6). In this work, we found that the synthesis of both nonstructural and structural viral proteins is inhibited by MG132. In principle, the effect of the drug could be due to the inhibition of any of the steps described above; i.e., it could block either the synthesis of the negative- or the positive-strand viral RNAs or the synthesis of the viral proteins necessary for the transcription and replication of the gRNA. In this context, it is hard to pinpoint the virus replication step inhibited by MG132.

There are, however, some indications of the stage of virus replication that could be affected by MG132. First, the inhibitory effect of MG132 is maintained when the drug is added to the cells at 4 hpi (Fig. 2A), indicating that the entry process of the virus is not affected by the drug, since the half-time for the release of HAstV RNA into the cytoplasm is about 130 min (7). Second, at early times of infection, the expression of the protease (a nonstructural protein) does not seem to be reduced, suggesting that the translation of the incoming gRNA into nonstructural proteins is not affected. Third, at 12 hpi, the level of gRNA is decreased by about 10-fold, while that of the agRNA is not reduced, and at this time, the level of the sgRNA is also reduced by 50%, indicating that the synthesis of the agRNA is not affected by MG132 at early times of infection. The reduction in the level of agRNA at 24 hpi, to about 50% of that of the control, could be the

consequence of the lower levels of the template gRNA available at earlier times.

Fourth, the fact that the level of sgRNA was diminished at both 12 and 24 hpi suggests that the primary effect of MG132 is on the accumulation of the two positive-sense viral RNAs, which in turn is reflected in the reduced synthesis of viral proteins. Altogether, these findings suggest that the RdRp complexes involved in the synthesis of positive and negative-sense RNAs could be different, although an effect of MG132 on RNA stability rather than on its synthesis could not be discarded. A similar observation has been reported for influenza virus, where proteasome activity is necessary for efficient polymerase function (26).

Why the proteolytic activity of the proteasome is required for the efficient production of positive-sense viral RNAs during HAsTV replication is not clear; however, there are a number of possible mechanisms. First, one of the more common features of the interaction between the UPS and viruses is the degradation of antiviral factors (47, 48). It is possible that a cellular factor that inhibits the RdRp complex in charge of the synthesis of positive-sense RNAs needs to be degraded for efficient gRNA and sgRNA production. A second alternative is that the stability and not the production of gRNA and sgRNA is affected by a cellular factor (for example, an RNase); thus, it is possible that the agRNA is present only in virus replication centers associated with membranes, where it might be protected from cellular RNases, but positive RNAs (gRNA and sgRNA), present in the cytoplasm, could be available for RNase degradation.

The role of the innate immune response in astrovirus infection has been poorly studied so far. It has been reported that it contributes to the control of murine astrovirus (MuAstV) (49), and recent publications reported that HAsTV-1 induces a mild and delayed interferon (IFN) response and that its replication is IFN sensitive (50, 51). Thus, it is possible that factors of the innate immune system that restrict astrovirus replication could be degraded by the proteasome during virus infection. Finally, it is possible that the proteasome could regulate the degradation or processing of proteins that modulate the production of positive-sense RNAs directly or indirectly. For example, its activity could be required for activating a signaling pathway involved in the formation of replication centers, as shown for brome mosaic virus; in this case, the formation of these centers depends on the activation of lipid metabolism in a process regulated by the proteasome (52, 53). In the case of HAsTV, it was reported that cellular proteins related to lipid metabolism are expressed in subcellular fractions where the viral RdRp is present, and RNA interference in the synthesis of these proteins reduced viral RNA production (54). Proteasome activity could be necessary for the stability, processing, and intracellular distribution of the viral proteins. It has been shown for turnip yellow mosaic virus that the UPS regulates the temporal synthesis of positive- and negative-sense viral RNAs by regulating the RdRp abundance (55, 56). Also, in the case of rotavirus, it has been shown that the inhibition of the UPS results in the delocalization of the viral polymerase (21, 22). One interesting idea derived from the results presented in this report is that if the proteolytic activity of the proteasome is necessary for the synthesis of the HAsTV positive-sense RNAs, the replication complexes that produce the positive- and negative-sense RNAs could be different.

MATERIALS AND METHODS

Cells, virus, and reagents. C2Bbe1 cells, derived from the colon adenocarcinoma Caco-2 cell line, were obtained from the American Type Culture Collection and propagated in a 10% CO₂ atmosphere at 37°C in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-HG) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) supplemented with nonessential amino acids (catalog number 1140; Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA) and 10% fetal bovine serum (FBS) (Cansera, Ontario, Canada). HAsV serotype 8 strain Yuc8 was isolated in our laboratory, and it was grown as described previously (57, 58). The siRNA UBC (smart pool) against the ubiquitin gene was purchased from Dharmacon Research (Lafayette, CO). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal and anti-mouse antibodies were purchased from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA), and an antitubulin monoclonal antibody (clone TU-01) was purchased from Invitrogen. Rabbit polyclonal antibody to ubiquitin was purchased from Cell Signaling. Rabbit polyclonal sera to the capsid protein of HAsV (Yuc8 strain), to the viral protease, and to the viral RdRp were previously described (59). The proteasome inhibitors PSI, MG132, and lactacystin (proteasome inhibitor set I) and the E1 inhibitor Pyr-41 were purchased from Calbiochem.

Determination of yields of infectious virus. Confluent C2Bbe1 cells grown in 96-multiwell plates were infected with Yuc8 at an MOI of 3 for 1 h at 37°C, and unbound virus was removed by washing.

When used, the drugs were present at the indicated times, added just at the end of the adsorption period, and maintained in medium until harvest, unless otherwise indicated. In all the experiments, the medium was supplemented with nonessential amino acids (NEAAs). The cells were collected at the indicated times and lysed by three cycles of freeze-thawing, and the virus present in the lysates was then activated by incubation with trypsin at 200 g/ml for 1 h at 37°C. Viral titers were determined by an immunoperoxidase focus determination assay, as described previously (11).

Western blots. Cells were infected with Yuc8 as described above. At the indicated times, the cells were lysed with Laemmli sample buffer, and the proteins were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose membranes (Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked with 5% nonfat dried milk in phosphate-buffered saline (PBS)–0.1% Tween and incubated at 4°C with the indicated primary antibodies diluted in PBS–0.1% Tween, followed by incubation with secondary, species-specific, horseradish peroxidase-conjugated or Alexa 647-conjugated antibodies (as indicated). For monoubiquitin detection, Tris-Tricine gels were used as described previously (22).

siRNA transfection. To transfect siRNAs into C2Bbe1 cells, a modified reverse transfection method was used (60). Briefly, the siRNAs (32 nM) were diluted in minimal essential medium (MEM) in a final volume of 15 l and mixed with 90 l of MEM containing 1.34 l of Oligofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) directly in the wells of a 48-well plate. The siRNA-Oligofectamine mix was incubated for 20 min at room temperature, and 200 l of a suspension of 100,000 cells/ml in DMEM supplemented with 15% of FBS was then added to each well. The final concentration of siRNA under these conditions was 1.5 nM. The cells were incubated for 48 h at 37°C.

Metabolic labeling. Cells were infected at an MOI of 3 and incubated with or without MG132 at the indicated concentrations, or siRNA-transfected cells were infected as previously described. At 17 hpi, the medium was replaced with Express-³⁵S labeling mix (Dupont, NEN), maintaining the same concentration of MG132, and the mixture was incubated for 1 h. Cells were then washed and lysed with Laemmli sample buffer. The proteins were separated by SDS-PAGE, and gels were stained with Coomassie blue and subjected to autoradiography.

RNA extraction. C2Bbe1 cells grown in 6-well plates were infected with Yuc8 at an MOI of 3 and incubated for 12 or 24 h in the presence or absence of 1 M MG132. Total RNA was extracted by using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA was resuspended in RNase-free water and quantified by spectrometry using a NanoDrop ND-1000 instrument. RNA from mock-infected cells was also obtained as a control.

qRT-PCR analysis. qRT-PCR was performed according to protocols for the standard First Strand cDNA synthesis kit with Maxima SYBR green qPCR master mix (Thermo Scientific, Waltham, MA). Quantitative analysis of data was performed by using the Prism 7000 analysis software program (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA). The primers used to amplify ORF1b astrovirus Yuc8 RNA for the gRNA and agRNA were described previously. Briefly, in these experiments, the primer used for cDNA synthesis determines the polarity of the strand analyzed, as was reported previously by us and others (51, 54, 61). To ensure that only the strand selected is reverse transcribed, after

the cDNA synthesis step, the reaction mix is heated to 90°C for 15 min and immediately transferred to ice to prevent the renaturation of the reverse transcriptase. After this step, PCR with both primers is set up. The primers used to amplify the sgRNA were forward primer 5'-TGGAACACTGCCTATCACGG-3' and reverse primer 5'-GAAGGCCAGAGTCACGAAGCT-3'. The results were normalized to the level of total glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA detected in each RNA sample. The relative fold changes in gene expression levels were calculated by the 2^{-C_T} method, where C_T is the threshold cycle, as described previously (54).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grants IN212211, IN207714, and IN208317 from DGAPA-UNAM. Luis A. Casorla-Pérez was a recipient of a scholarship from CONACyT.

We thank Rafaela Espinosa and Pedro Romero for their valuable technical assistance and Andrea Murillo and Noemí Flores for their advice on qPCR assays.

REFERENCES

- De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G. 2011. Astrovirusinfections in humans and animals—molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol* 11:1529–1544. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.024>.
- Bosch A, Pinto RM, Guix S. 2014. Human astroviruses. *Clin Microbiol Rev* 27:1048–1074. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-14>.
- Brown JR, Morfopoulou S, Hubb J, Emmett WA, Ip W, Shah D, Brooks T, Paine SM, Anderson G, Virasami A, Tong CY, Clark DA, Plagnol V, Jacques TS, Qasim W, Hubank M, Breuer J. 2015. Astrovirus VA1/ HMO-C: an increasingly recognized neurotropic pathogen in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 60:881–888. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu940>.
- Naccache SN, Peggs KS, Mattes FM, Phadke R, Garson JA, Grant P, Samayoa E, Federman S, Miller S, Lunn MP, Gant V, Chiu CY. 2015. Diagnosis of neuroinvasive astrovirus infection in an immunocompromised adult with encephalitis by unbiased next-generation sequencing. *Clin Infect Dis* 60: 919–923. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu912>.
- Fuentes C, Bosch A, Pinto RM, Guix S. 2012. Identification of human astrovirus genome-linked protein (VPg) essential for virus infectivity. *J Virol* 86:10070–10078. <https://doi.org/10.1128/JVI.00797-12>.
- Mendez E, Arias CF. 2013. Astroviruses, p 981–1000. *In* Knipe DE, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ed), *Fields virology*, 6th ed, vol 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Mendez E, Munoz-Yanez C, Sanchez-San Martin C, Aguirre-Crespo G, Banos-Lara MDR, Gutierrez M, Espinosa R, Acevedo Y, Arias CF, Lopez S. 2014. Characterization of human astrovirus cell entry. *J Virol* 88: 2452–2460. <https://doi.org/10.1128/JVI.02908-13>.
- Mendez E, Aguirre-Crespo G, Zavala G, Arias CF. 2007. Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. *J Virol* 81:10649–10658. <https://doi.org/10.1128/JVI.00785-07>.
- Guix S, Caballero S, Bosch A, Pinto RM. 2004. C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA. *J Virol* 78:13627–13636. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.24.13627-13636.2004>.
- Banos-Lara MDR, Mendez E. 2010. Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism. *Virology* 401:322–332. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.028>.
- Mendez E, Salas-Ocampo E, Arias CF. 2004. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J Virol* 78:8601–8608. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.16.8601-8608.2004>.
- Goldberg AL. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426:895–899. <https://doi.org/10.1038/nature02263>.
- Schwartz AL, Ciechanover A. 2009. Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:73–96. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.051208.165340>.
- Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M. 2008. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim Biophys Acta* 1786: 153–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2008.05.004>.
- Goldberg AL. 2007. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 35:12–17. <https://doi.org/10.1042/BST0350012>.
- Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. 2005. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:599–609. <https://doi.org/10.1038/nrm1700>.
- Hanson PI, Cashikar A. 2012. Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:337–362. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154152>.
- Stadtmueller BM, Hill CP. 2011. Proteasome activators. *Mol Cell* 41:8–19. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.020>.
- Lin D, Zhong B. 2015. Regulation of cellular innate antiviral signaling by ubiquitin modification. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 47: 149–155. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmu133>.
- Calistri A, Munegato D, Carli I, Parolin C, Palu G. 2014. The ubiquitin-conjugating system: multiple roles in viral replication and infection. *Cells* 3:386–417. <https://doi.org/10.3390/cells3020386>.
- Contin R, Arnoldi F, Mano M, Burrone OR. 2011. Rotavirus replication requires a functional proteasome for effective assembly of viroplasm. *J Virol* 85:2781–2792. <https://doi.org/10.1128/JVI.01631-10>.
- Lopez T, Silva-Ayala D, Lopez S, Arias CF. 2011. Replication of the rotavirus genome requires an active ubiquitin-proteasome system. *J Virol* 85:11964–11971. <https://doi.org/10.1128/JVI.05286-11>.
- Gilfoy F, Fayzulin R, Mason PW. 2009. West Nile virus genome amplification requires the functional activities of the proteasome. *Virology* 385:74–84. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.034>.
- Cheng S, Yan W, Gu W, He Q. 2014. The ubiquitin-proteasome system is required for the early stages of porcine circovirus type 2 replication. *Virology* 456–457:198–204. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.03.028>.
- Karpe YA, Meng XJ. 2012. Hepatitis E virus replication requires an active ubiquitin-proteasome system. *J Virol* 86:5948–5952. <https://doi.org/10.1128/JVI.07039-11>.
- Kirui J, Mondal A, Mehle A. 28 September 2016. Ubiquitination upregulates influenza virus polymerase function. *J Virol* <https://doi.org/10.1128/JVI.01829-16>.
- Sahana N, Kaur H, Basavaraj, Tena F, Jain RK, Palukaitis P, Canto T, Praveen S. 2012. Inhibition of the host proteasome facilitates papaya ringspot virus accumulation and proteasomal catalytic activity is modulated by viral factor HcPro. *PLoS One* 7:e52546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052546>.
- Mitchell AM, Samulski RJ. 2013. Mechanistic insights into the enhancement of adeno-associated virus transduction by proteasome inhibitors. *J Virol* 87:13035–13041. <https://doi.org/10.1128/JVI.01826-13>.
- Peterson MD, Mooseker MS. 1992. Characterization of the enterocytelike brush border cytoskeleton of the C2BBE clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *J Cell Sci* 102(Part 3):581–600.
- Bush KT, Goldberg AL, Nigam SK. 1997. Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J Biol Chem* 272:9086–9092. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9086>.
- Grossin L, Etienne S, Gaborit N, Pinzano A, Cournil-Henrionnet C, Gerard C, Payan E, Netter P, Terlain B, Gillet P. 2004. Induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death in vitro and in vivo. *Biorheology* 41:521–534.
- Kim D, Kim SH, Li GC. 1999. Proteasome inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 254:264–268. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9840>.
- Neznanov N, Dragunsky EM, Chumakov KM, Neznanova L, Wek RC, Gudkov AV, Banerjee AK. 2008. Different effect of proteasome inhibition on vesicular stomatitis virus and poliovirus replication. *PLoS One* 3:e1887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001887>.

34. Jiang HY, Wek RC. 2005. Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2alpha) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition. *J Biol Chem* 280:14189–14202. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413660200>.
35. Yang Y, Kitagaki J, Dai RM, Tsai YC, Lorick KL, Ludwig RL, Pierre SA, Jensen JP, Davydov IV, Oberoi P, Li CC, Kenten JH, Beutler JA, Vousden KH, Weissman AM. 2007. Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Res* 67:9472–9481. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0568>.
36. Kapuria V, Peterson LF, Showalter HD, Kirchoff PD, Talpaz M, Donato NJ. 2011. Protein cross-linking as a novel mechanism of action of a ubiquitin-activating enzyme inhibitor with anti-tumor activity. *Biochem Pharmacol* 82:341–349. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.05.012>.
37. Oh C, Park S, Lee EK, Yoo YJ. 2013. Downregulation of ubiquitin level via knockdown of polyubiquitin gene Ubb as potential cancer therapeutic intervention. *Sci Rep* 3:2623. <https://doi.org/10.1038/srep02623>.
38. Patnaik A, Chau V, Wills JW. 2000. Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13069–13074. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.24.13069>.
39. Bauckman KA, Owusu-Boaitey N, Mysorekar IU. 2015. Selective autophagy: xenophagy. *Methods* 75:120–127. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.12.005>.
40. Guix S, Bosch A, Ribes E, Martinez LD, Pinto RM. 2004. Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells. *Virology* 319:249–261. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.10.036>.
41. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761–771. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(94\)90462-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(94)90462-6).
42. Figueiredo-Pereira ME, Berg KA, Wilk S. 1994. A new inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) induces accumulation of ubiquitin-protein conjugates in a neuronal cell. *J Neurochem* 63:1578–1581. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63041578.x>.
43. Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL. 1995. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268:726–731. <https://doi.org/10.1126/science.7732382>.
44. Saji C, Higashi C, Niinaka Y, Yamada K, Noguchi K, Fujimuro M. 2011. Proteasome inhibitors induce apoptosis and reduce viral replication in primary effusion lymphoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 415:573–578. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.107>.
45. Bao W, Gu Y, Ta L, Wang K, Xu Z. 2016. Induction of autophagy by the MG132 proteasome inhibitor is associated with endoplasmic reticulum stress in MCF7 cells. *Mol Med Rep* 13:796–804. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4599>.
46. Lan D, Wang W, Zhuang J, Zhao Z. 2015. Proteasome inhibitor-induced autophagy in PC12 cells overexpressing A53T mutant alpha-synuclein. *Mol Med Rep* 11:1655–1660. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.3011>.
47. Bhoj VG, Chen ZJ. 2009. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 458:430–437. <https://doi.org/10.1038/nature07959>.
48. Oudshoorn D, Versteeg GA, Kikkert M. 2012. Regulation of the innate immune system by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Cytokine Growth Factor Rev* 23:273–282. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.08.003>.
49. Yokoyama CC, Loh J, Zhao G, Stappenbeck TS, Wang D, Huang HV, Virgin HW, Thackray LB. 2012. Adaptive immunity restricts replication of novel murine astroviruses. *J Virol* 86:12262–12270. <https://doi.org/10.1128/JVI.02018-12>.
50. Guix S, Perez-Bosque A, Miro L, Moreto M, Bosch A, Pinto RM. 2015. Type I interferon response is delayed in human astrovirus infections. *PLoS One* 10:e0123087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123087>.
51. Marvin SA, Huerta CT, Sharp B, Freiden P, Cline TD, Schultz-Cherry S. 2015. Type I interferon response limits astrovirus replication and protects against increased barrier permeability in vitro and in vivo. *J Virol* 90:1988–1996. <https://doi.org/10.1128/JVI.02367-15>.
52. Lee WM, Ahlquist P. 2003. Membrane synthesis, specific lipid requirements, and localized lipid composition changes associated with a positive-strand RNA virus RNA replication protein. *J Virol* 77:12819–12828. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.23.12819-12828.2003>.
53. Wang X, Diaz A, Hao L, Gancarz B, den Boon JA, Ahlquist P. 2011. Intersection of the multivesicular body pathway and lipid homeostasis in RNA replication by a positive-strand RNA virus. *J Virol* 85:5494–5503. <https://doi.org/10.1128/JVI.02031-10>.
54. Murillo A, Vera-Estrella R, Barkla BJ, Mendez E, Arias CF. 2015. Identification of host cell factors associated with astrovirus replication in CaCo-2 cells. *J Virol* 89:10359–10370. <https://doi.org/10.1128/JVI.01225-15>.
55. Chenon M, Camborde L, Cheminant S, Jupin I. 2012. A viral deubiquitylating enzyme targets viral RNA-dependent RNA polymerase and affects viral infectivity. *EMBO J* 31:741–753. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.424>.
56. Camborde L, Planchais S, Tournier V, Jakubiec A, Drugeon G, Lacassagne E, Pflieger S, Chenon M, Jupin I. 2010. The ubiquitin-proteasome system regulates the accumulation of Turnip yellow mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase during viral infection. *Plant Cell* 22:3142–3152. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072090>.
57. Mendez-Toss M, Romero-Guido P, Munguia ME, Mendez E, Arias CF. 2000. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *J Gen Virol* 81:2891–2897. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-2891>.
58. Mendez E, Fernandez-Luna T, Lopez S, Mendez-Toss M, Arias CF. 2002. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. *J Virol* 76:7996–8002. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.16.7996-8002.2002>.
59. Mendez E, Salas-Ocampo MP, Munguia ME, Arias CF. 2003. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *J Virol* 77:11378–11384. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.21.11378-11384.2003>.
60. Lopez T, Silva-Ayala D, Lopez S, Arias CF. 2012. Methods suitable for high-throughput screening of siRNAs and other chemical compounds with the potential to inhibit rotavirus replication. *J Virol Methods* 179:242–249. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.11.010>.
61. Ayala-Breton C, Arias M, Espinosa R, Romero P, Arias CF, Lopez S. 2009. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J Virol* 83:8819–8831. <https://doi.org/10.1128/JVI.02308-08>.

Apéndice II

Artículo 2: Most rotavirus strains require the cation-independent mannose-6-phosphate receptor, sortilin-1, and cathepsins to enter cells.

Virus Research 245 (2018) 44–51



Contents lists available
ScienceDirect
Virus Research



Most rotavirus strains require the cation-independent mannose-6-phosphate receptor, sortilin-1, and cathepsins to enter cells



Marco A. Díaz-Salinas^a, Luis A. Casorla^b, Tomás López^b, Susana López^b, Carlos F. Arias^{b,*}

^a Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

^b Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Rotavirus
Virus entry
Mannose-6-phosphate receptors
Sortilin
Cathepsin

ABSTRACT

Cathepsins, endosomal acid proteases, are transported from the trans-Golgi network to late endosomes by the mannose-6-phosphate receptor (M6PR). We have previously demonstrated that some rotavirus strains, like UK, Wa, WI61, DS-1, and YM, require the cation-dependent (CD-) M6PR and cathepsins to enter from late endosomes to the cytoplasm in MA104 cells, while other strains, like the simian strain RRV, which enter cells from maturing endosomes, do not. However, the role of other trans-Golgi network-late endosome transporters, such as the cation-independent (CI-) M6PR and sortilin-1, has not been evaluated. In this work, we found that several rotavirus strains that require the CD-M6PR for cell entry are also dependent on CI-M6PR and sortilin-1. Furthermore, we showed that the infectivity of all these rotavirus strains also requires cathepsins to enter not only MA104 cells, but also human intestinal Caco-2 cells. This study identifies sortilin-1 as a novel cell factor necessary for the infectivity of a virus; in addition, our results strongly suggest that cathepsins could be common cell factors needed for the infectivity of most rotavirus strains.

1. Introduction

Rotaviruses, members of the family Reoviridae, are non-enveloped viruses and major etiologic agents of viral gastroenteritis in infants and young children worldwide (Parashar et al., 2003). These viruses are composed of a triple-layered protein capsid that surrounds the viral genome, the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and the viral capping enzyme. The outermost layer is composed by the glycoprotein VP7 that forms the smooth surface of the virus, and the spike protein VP4 that functions as the virus attachment protein (López and Arias, 2006). Trypsin treatment of rotavirus is essential for virus cell entry, resulting in the specific cleavage of VP4 to yield the products VP8 and VP5 (Arias et al., 1996; Clark et al., 1981; Espejo et al., 1981; Estes et al., 1981; López et al., 1985). It has been proposed that VP4 undergoes conformational changes during the entry process leading to conversion of the mature infectious rotavirus triple-layer particles (TLPs) into transcriptionally active double-layered particles (DLPs) that start transcribing the viral genome in the cytosolic compartment

(Dormitzer et al., 2004; Trask et al., 2010; Yoder et al., 2009). However, a direct functional correlation of the proposed structural changes in VP4 with cellular factors that might trigger these changes has not been directly shown.

Several molecules have been involved as cellular receptors and/or co-receptors for rotaviruses, including, sialic acid, gangliosides, integrins, and the heat shock protein hsc70 (Coulson et al., 1997; Guerrero et al., 2002; Guerrero et al., 2000; Keljo and Smith, 1988; López and Arias, 2004; Martinez et al., 2013), and more recently the VP4 of some virus strains was found to attach to human histo-blood group antigens (Hu et al., 2012; Huang et al., 2012; Liu et al., 2012). In addition, it has recently been found that the tight-junction proteins JAM-A, occludin, and ZO-1 are important for cell entry of some rotavirus strains (Torres-Flores et al., 2015). After the initial interactions of the virus with cell surface molecules, different rotavirus strains enter into MA104 cells through distinct endocytic pathways that are determined by the spike protein VP4 (Diaz-Salinas et al., 2013; Gutiérrez et al., 2010; Sánchez-San Martín et al., 2004; Wolf et al., 2012; Wolf

Abbreviations: DLPs, double layered particles; CD, cation-dependent; CI, cation-independent; CTSB, cathepsin B; CTSL1, Cathepsin L1; CTSS, Cathepsin S; EEs, early endosomes; EP, early-penetrating; GM2AP, GM2 activator protein; LDH, lactate dehydrogenase; LEs, late endosomes; LP, late-penetrating; LIMP2, lysosomal integral membrane protein 2; M6PR, mannose-6-phosphate receptor(s); MEs, maturing endosomes; ReoT1L, mammalian reovirus type 1 Lang; SORT1, Sortilin-1; TGN, trans-golgi-network; TLPs, triple-layered particles; Vim, Vimentin

*Corresponding author.

E-mail address: arias@ibt.unam.mx (C.F. Arias).

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.12.002>

Received 10 September 2017; Received in revised form 4 December 2017; Accepted 6 December 2017 Available online

21 December 2017

0168-1702/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1

Characteristics of the rotavirus strains used in this study.

Rotavirus strain	Origin	Genotype	Cytosol entry-level organelle ^a	CD-M6PR requirement ^b	Ref.
RRV	Simian	G3P[3]	ME	No	Diaz-Salinas et al. (2014), Silva-Ayala et al. (2013), Wolf et al. (2012), Wolf et al. (2011)
UK	Bovine	G6P[5]	LE	Yes	Diaz-Salinas et al. (2014), Wolf et al. (2012)
SA11-4S	Simian	G3P[2]	EE	No	Diaz-Salinas et al. (2014)
Wa	Human	G1P[8]	LE	Yes	Diaz-Salinas et al. (2014), Silva-Ayala et al. (2013)
WI61	Human	G9P[8]	LE	Yes	Diaz-Salinas et al. (2014)
DS-1	Human	G2P[4]	LE	Yes	Diaz-Salinas et al. (2014), Silva-Ayala et al. (2013)
YM	Porcine	G11P[7]	LE	Yes	Diaz-Salinas et al. (2014)

^a Endocytic organelle from which rotavirus enters to the cytoplasm. EE, Early Endosomes; ME, Maturing Endosomes; LE, Late Endosomes.

et al., 2011).

Independently of the nature of the cell surface receptor and the endocytic pathway used for cell internalization, all rotavirus strains tested follow a vesicular traffic which converge in early endosomes (EEs) and reach maturing endosomes (MEs) (reviewed in reference (Arias et al., 2015)). Rotavirus strains RRV and SA11-4S presumably reach the cytoplasm from these organelles to continue their replication cycle and they are called early-penetrating (EP) viruses (Diaz-Salinas et al., 2014). However, most other rotavirus strains need to reach late endosomes (LEs) to infect MA104 cells (Table 1), and thus they have been termed late-penetrating (LP) rotaviruses (Diaz-Salinas et al., 2014).

The delivery of newly synthesized lysosomal cell factors, such as cathepsins, from the trans-Golgi-network to LEs (TGN-LEs), is a dynamic process required for obtaining mature LEs (Chia et al., 2013). This action is carried out by specialized transporters, such as the mannose-6-phosphate receptors (M6PRs). Two M6PRs have been described as part of the M6PR-dependent sorting pathways, the 46-kDa cation-dependent CD-M6PR and the 300-kDa cation-independent M6PR (CI-M6PR) (Braulke and Bonifacino, 2009). Both types of M6PRs bind lysosomal enzymes but they can also selectively transport other cargoes, such as the insulin-like growth factor II and the transforming growth factor- β 1, among others (Ghosh et al., 2003). Moreover, M6PR-independent TGN-LE transporters have been reported, the most studied being the sorting pathway mediated by the receptor sortilin-1, which transports several non-enzymatic proteins such as prosaposin and the GM2 activator protein (GM2AP), as well as hydrolases like acid sphingomyelinase, and cathepsins D and H (Coutinho et al., 2012).

We have previously demonstrated that the presence of CD-M6PR is important for the cell entry of the LP rotaviruses UK, Wa, WI61, DS-1, and YM, while it is not relevant for EP rotaviruses RRV and SA11-4S (Diaz-Salinas et al., 2014). Furthermore, we also showed that the endolysosomal proteases cathepsin B, L1, and S, are important cell factors for the infectivity of LP but not for EP rotaviruses (Diaz-Salinas et al., 2014).

Because TGN-LE transporters have in common the trafficking of cell factors such as cathepsins (Braulke and Bonifacino, 2009; Coutinho et al., 2012), we investigated whether CI-M6PR and sortilin-1 could also have a role in rotavirus infection. Through an RNAi approach we found that the cell entry of LP rotaviruses was significantly decreased in MA104 cells transfected with siRNAs against these two transporters. We also show that the requirement of rotavirus infectivity for the activity of cathepsins is essentially a general trait for LP strains. Furthermore, we showed that acidic proteases are also important for the infection of LP rotaviruses in intestinal Caco-2 cells, suggesting that cathepsins are factors required for the infectivity of these viruses in different cell lines.

2. Material and methods

2.1. Cells and viruses

The rhesus monkey epithelial cell line MA104 and the murine fibroblasts L929 cell line (ATCC) were grown in advanced Eagle's minimal essential medium (MEM) (Invitrogen) supplemented with 5% and 10% fetal bovine serum (FBS), respectively, at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The human intestinal epithelial cells (Caco-2, clone C2Bb1) were grown in high glucose DMEM supplemented with 10% FBS and non-essential amino acids. The rhesus rotavirus RRV (G3P[3]) and bovine rotavirus UK (G6P[5]) were kindly donated by Y. Hoshino (NIAID-NIH, Bethesda, MD), and have been previously described (DiazSalinas et al., 2013; Feng et al., 2009). Human rotavirus strains Wa (G1P[8]) and DS-1 (G2P[4]) were obtained from H. B. Greenberg (Stanford University, Stanford CA), and rotavirus WI-61 (G9P[8]) was obtained from F. H. Clark (Wistar Institute, Philadelphia PA; through M. K. Estes). Simian rotavirus SA11-4S (clone 3; G3P[2]) was obtained from M. K. Estes (Baylor College of Medicine, Houston Texas), and porcine strain YM (G11P[7]) was isolated in our laboratory (Ruíz et al., 1988). All rotavirus strains were propagated in MA104 cells as previously described (Pando et al., 2002). Rotavirus cell lysates were activated with porcine trypsin (10 µg/ml) for 30 min at 37 °C. The mammalian reovirus type 1 Lang (ReoT1L) was a kind donation of T. S. Dermody (Vanderbilt University, Nashville TN). ReoT1L was propagated in L929 cells and the viral title was determined in MA104 cells as previously described (Cuadras et al., 1997; Gutiérrez et al., 2010).

2.2. Reagents and antibodies

Porcine trypsin powder 1:250 was purchased from Gibco™ (Invitrogen Corporation) and it was dissolved in PBS to obtain a stock solution of 1 mg/ml. The small interfering RNAs (siRNA) to the luciferase gene, and the smart pool siRNAs against the Cl-M6PR, sortilin-1, cathepsin B, L1, and S, were purchased from Dharmacon Research (Lafayette, CO). Rabbit polyclonal sera against cathepsin B, L1, and S were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit polyclonal antibodies were from Perkin Elmer Life Sciences (Waltham, MA). The rabbit polyclonal sera, raised against purified rotavirus TLPs, purified reovirus particles (α-Reo), and the rabbit anti-vimentin serum against recombinant vimentin (α-Vim) were produced in our laboratory and their use has been reported (Diaz-Salinas et al., 2013; Gutiérrez et al., 2010). Cathepsin B inhibitor (CA-074) was obtained from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO), and cathepsin L inhibitor (Z-FF-FMK) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Calbiochem, Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Leupeptin was obtained from Roche Diagnostics Corporation

(Indianapolis, IN).

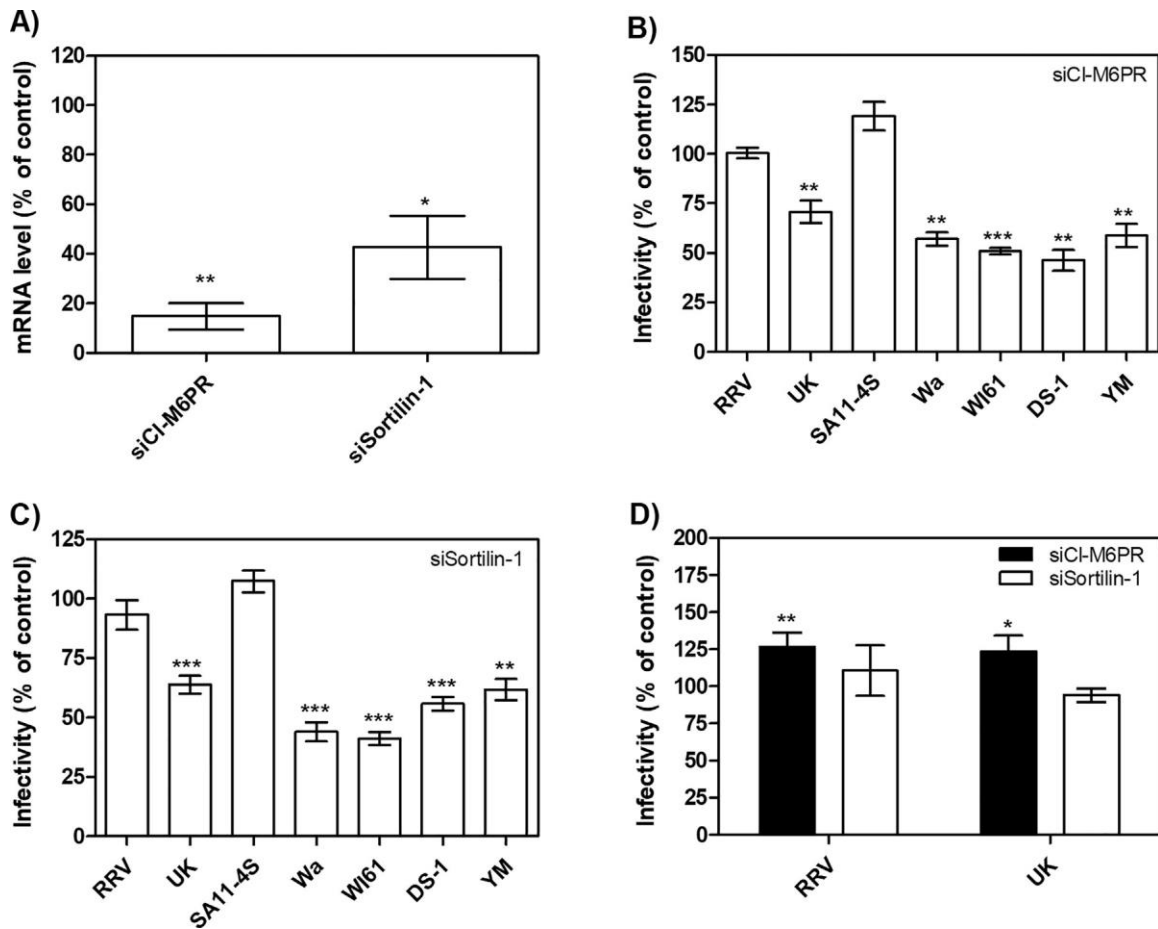


Fig. 1. Effect of silencing the expression of TGN-LE transporters on rotavirus infectivity. (A) MA104 cells transfected with siRNAs against CI-M6PR (siCI-M6PR), sortilin-1 (siSortilin-1), or with an irrelevant siRNA were lysed 86 h post-transfection and total RNA was purified for qRT-PCR assay as described in Material and Methods, Section 2.7. The CI-M6PR or sortilin-1 mRNA values were normalized to those of GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA in cells transfected with the respective siRNA. Data are expressed as the percentage of the CI-M6PR or sortilin-1 observed in cells transfected with an irrelevant siRNA, which represents 100% of the mRNA expression. The asterisks indicate significant differences between the mRNA expressions detected in the experimental conditions (siCI-M6PR or siSortilin-1 siRNAs) compared to that observed in cells transfected with an irrelevant siRNA. *, $P < .05$; **, $P < .01$. (B) MA104 cells transfected with siRNAs against CI-M6PR (siCI-M6PR) or (C) sortilin-1 (siSortilin-1), were infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02. At 14 hpi the cells were fixed and immunostained as described in Section 2.5. (D) DLPs from the indicated rotavirus strains were lipofected into MA104 cells previously transfected with siRNAs against the indicated TGN-LE transporters. At 14 hpi the cells were fixed and immunostained as described in Section 2.5. Data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to the infection of cells transfected with an irrelevant siRNA, which represents 100% infectivity. The arithmetic means \pm SEM of at least two independent experiments performed in duplicate are shown. The asterisks indicate significant differences between the infectivity of each virus in siRNA-transfected cells, compared to that observed in cells transfected with an irrelevant siRNA. *, $P < .05$; **, $P < .01$; ***, $P < .001$.

2.3. Transfection of siRNAs

siRNAs were transfected into MA104 cell by a reverse method, as described (Gutiérrez et al., 2010). 72 h post-transfection (hpt) the cells were washed twice with MEM and subsequently infected with the indicated rotavirus strain. None of these transfections was toxic for the cells, as determined by a lactate dehydrogenase (LDH) release assay, using a commercial kit (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO).

2.4. Treatment of cells with endo-lysosomal protease inhibitors

MA104 or Caco-2 cells were pre-treated with 25 μ M leupeptin (in water) or with 5 μ M cathepsin B or L inhibitors (in DMSO) for 1 h at 37 °C as previously described ([Diaz-Salinas et al., 2014](#)). As controls, the cells were mock-treated for leupeptin and cathepsin inhibitors. Virus inoculum at an MOI of 0.02 was adsorbed for 1 h at 37 °C and the infection was left to proceed for 14 or 16 h, as described below. The indicated protease inhibitor was maintained the entire time of infection. None of the cell treatments with protease inhibitors was toxic for the cells, as determined by the LDH release assay.

2.5. Infectivity assays

MA104 cells transfected with the indicated siRNA, or both MA104 and Caco-2 cell lines treated with the indicated endo-lysosomal proteases, were washed twice with MEM and infected with an MOI of 0.02 using cell lysates of the indicated rotavirus strain. After 1 h of adsorption, the virus was removed, and the cells were washed twice with MEM. At 14 or 16 h post-infection (hpi) for rotavirus or reovirus infection, respectively, the cell monolayers were fixed and the infected cells were stained by an immunoperoxidase focus detection assay as previously described ([Pando et al., 2002](#)).

2.6. DLPs Lipofection

MA104 cells transfected with the indicated siRNAs were lipofected with rotavirus DLPs as previously described ([Gutiérrez et al., 2010](#)). At 14 hpi the cells were fixed and the infected cells were detected by an immunoperoxidase focus detection assay as described above.

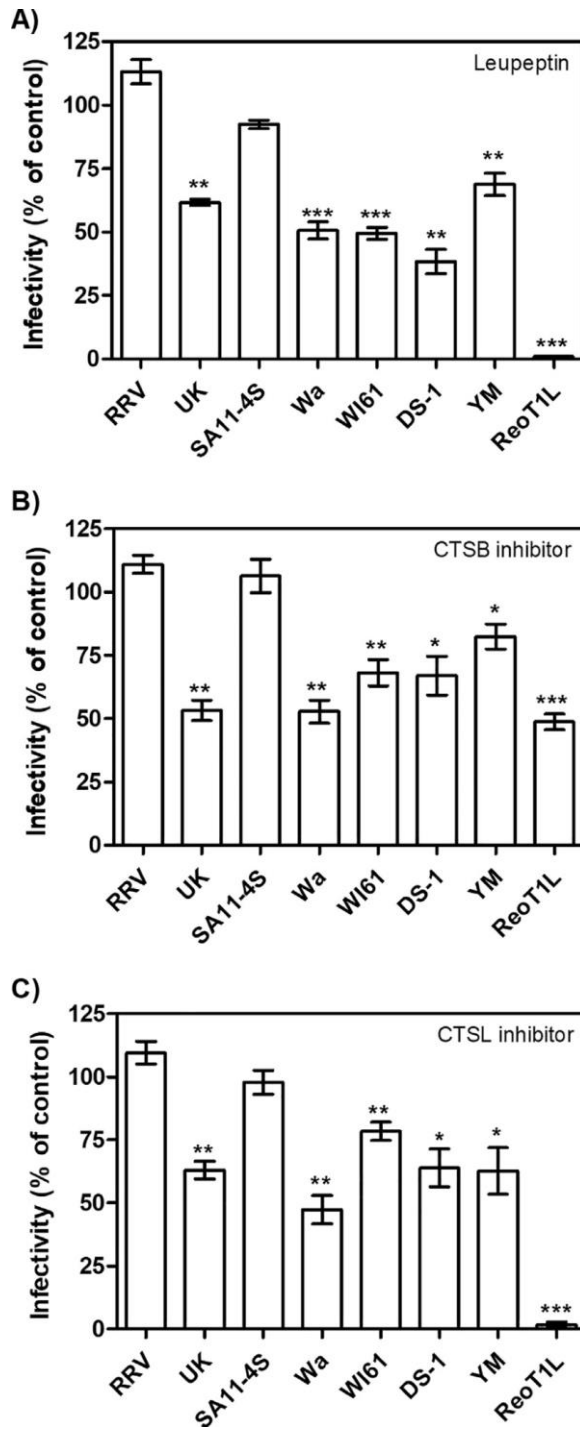


Fig. 2. Effect of cathepsin inhibitors on the infectivity of rotavirus in MA104 cells. MA104 cells were treated or mock treated with (A) leupeptin (25 μ M), (B) the cathepsin B inhibitor CA-074 (5 μ M) or, (C) the cathepsin L inhibitor Z-FF-FMK (5 μ M) for 1 h at 37 $^{\circ}$ C, and then infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02. Cells infected with the indicated rotavirus strain or reovirus type 1 (ReoT1L) were fixed and immunostained at 14 or 16 hpi, respectively, as described in Section 2.5. Data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to the infectivity obtained in mock-treated cells. The arithmetic means \pm SEM of at least two independent experiments performed in duplicate are shown. The asterisks indicate significant differences between the infectivity of each virus in inhibitor-treated cells with respect to mock-treated cells. *, $P < .05$; **, $P < .01$; ***, $P < .001$.

2.7. Immunoblots

The cells were lysed in Laemmli sample buffer and denatured by boiling for 5 min. The cell lysates were then subjected to SDS-10% PAGE and transferred to Immobilon NC (Millipore) membranes. The membranes were processed for immunoblotting as previously described (Gutiérrez et al., 2010).

2.8. qRT-PCR

The efficiency for silencing the expression of CI-M6PR and sortilin-1 by RNAi was determined by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) as previously described (Ayala-Breton et al., 2009; SilvaAyala et al., 2013). The forward primer 6333-F (5'-GCAGAAGCTGGG TGTCATAGG-3') used to evaluate the CI-M6PR mRNA expression was previously described (Rose et al., 2007), while the sequence of the reverse primer was 5'-GTGCAGCTGTCGATATCAAACCTC-3'. The sequences of the forward and reverse primers used to evaluate the sortilin-1 mRNA expression levels were 5'-CTGGTCACAGTCGTAGCAGG-3' and 5'-CAAGAGGTCCTCATCTGAGTCATC-3', respectively. The primers to detect GAPDH mRNA have been previously described (Ayala-Breton et al., 2009).

2.9. Statistical analysis

Statistical significance was evaluated by using a two-tailed paired t test with GraphPad Prism (version 5.0) software (GraphPad Software, Inc.). P values of less than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. CI-M6PR and sortilin-1 are important for the cell entry of LP rotaviruses in MA104 cells

With the aim of investigating whether the CI-M6PR and sortilin-1 are involved in the cell entry of rotaviruses, we evaluated the infectivity of EP (strains RRV and SA11-4S) and LP (strains UK, Wa, WI61, DS-1, and YM) rotaviruses (Table 1) in MA104 cells transfected with siRNAs directed to either CI-M6PR or sortilin-1 (Fig. 1). The level of sortilin-1 and CI-M6PR mRNAs was decreased by 60% and 85%, respectively, when cells were transfected with the corresponding siRNA (Fig. 1A). The cell viability, as determined by an LDH release assay, was not affected by the siRNAs treatment (data not shown).

The infectivity of RRV and SA11-4S was not affected when cells were transfected either with CI-M6PR (Fig. 1B) or sortilin-1 (Fig. 1C) siRNAs, while the infectivity of all LP rotaviruses assayed was significantly decreased, by 30–60%, as compared to cells transfected with an irrelevant siRNA used as control. To investigate if the decreased infectivity of LP rotaviruses was at the entry level, transcriptionally active double-layered particles (DLPs) of RRV or UK rotavirus strains were lipofected into MA104 cells previously transfected with siRNAs against either CI-M6PR or sortilin-1. As we and others authors have previously shown, lipofection of DLPs bypasses the virus cell entry process, since the actively transcribing particles are directly delivered in the cytoplasm (Bass et al., 1992; Diaz-Salinas et al., 2014; Gutiérrez et al., 2010; Silva-Ayala et al., 2013). As can be seen it in Fig. 1D, the

infectivity of RRV and UK was not decreased by the siRNA treatment when DLPs were transfected, suggesting that CI-M6PR and sortilin-1 are cell factors needed during the cell entry of LP rotaviruses.

3.2. LP- but not EP-rotaviruses require cathepsins to enter MA104 cells

We have previously shown that the LP-rotavirus UK requires cathepsins to infect MA104 cells, while the EP-rotavirus RRV does not (Diaz-Salinas et al., 2014). This observation led us to investigate whether other LP-rotavirus strains (Wa, WI61, DS-1, and YM) need

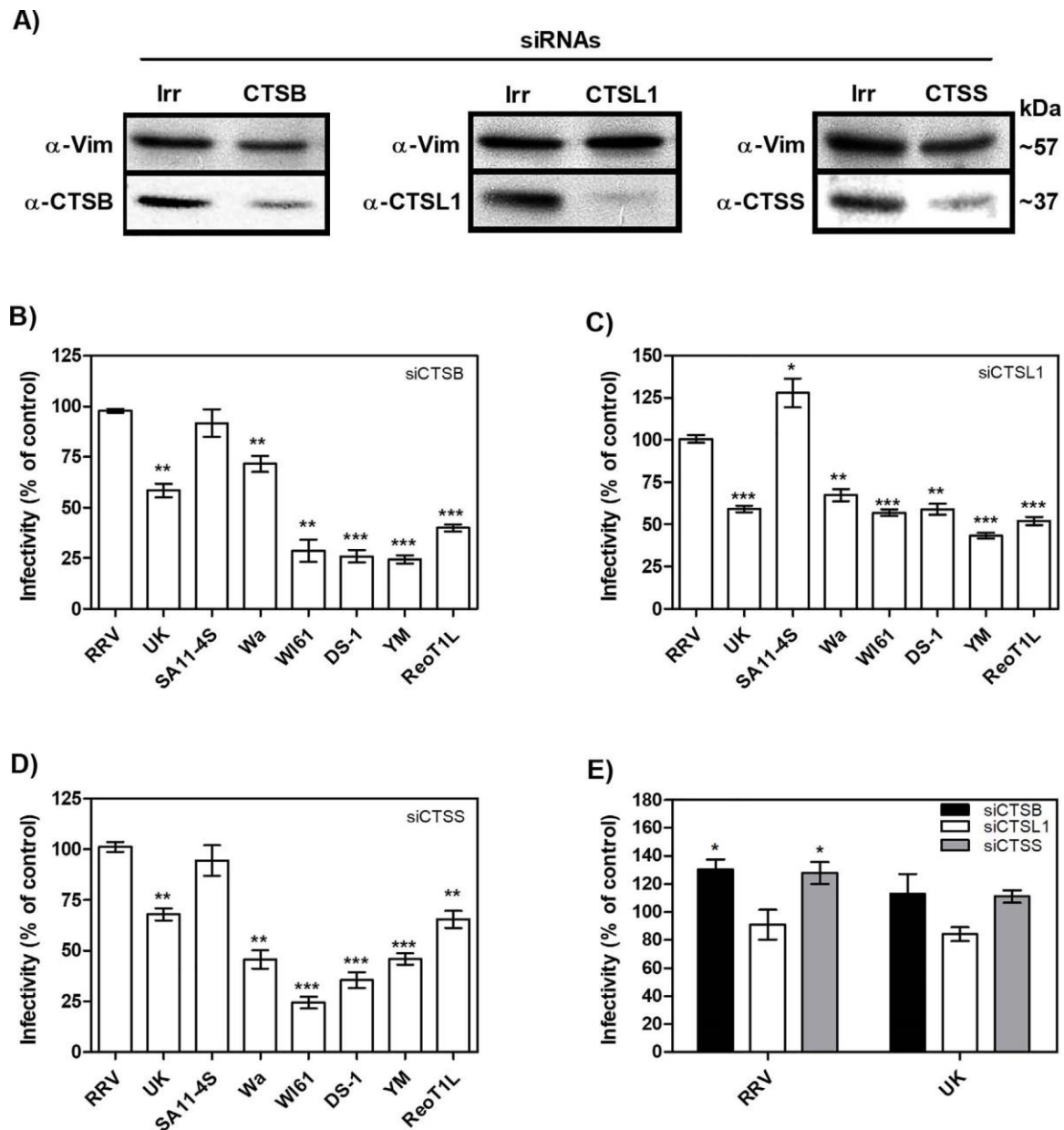


Fig. 3. Effect of silencing the expression of endosomal cathepsins on the infectivity of different rotavirus strains. (A) Representative immunoblots to detect the abundance of cathepsins B, L, and S in MA104 cells transfected with either irrelevant, cathepsin B, L, or S siRNAs (Irr, CTSB, CTSL1 and CTSS, respectively). Vimentin (Vim) was used as loading control. The antibodies used are indicated. MA104 cells transfected with siRNAs against cathepsin B (B), cathepsin L (C), or cathepsin S (D) were infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02. Cells infected with the indicated rotavirus strain or reovirus type 1 (ReoT1L) were fixed and immunostained at 14 or 16 hpi, respectively, as described in Section 2.5. (E) DLPs from the

indicated rotavirus strains were lipofected into MA104 cells that were previously transfected with siRNAs against the indicated cathepsin proteases. At 14 hpi the cells were fixed and immunostained as described in Section 2.5. Data are expressed as the percent infectivity of each virus as compared to their infectivity in cells transfected with an irrelevant siRNA. The arithmetic means \pm SEM of at least two independent experiments performed in duplicate are shown. The asterisks indicate significant differences between the infectivity of each virus in control and experimental conditions. ** $P < .01$; ***, $P < .001$.

cathepsins for infection. For this, the infectivity of the indicated rotavirus strains was evaluated in cells treated with leupeptin, a broadspectrum inhibitor of endo-lysosomal proteases, or with a specific inhibitor of cathepsin B (CA-074), or with Z-FF-FMK an inhibitor of cathepsin L (Fig. 2). Reovirus type 1 strain Lang (ReoT1L) was used as positive control, since it is well known it requires cathepsins during cell-entry (Ebert et al., 2002; Golden et al., 2004). The infectivity of this control virus, as well as that corresponding to the LP-rotavirus strains were significantly decreased in cells treated with all three inhibitors as compared to control, untreated cells (Fig. 2). Of interest, similarly to RRV, the infectivity of the EP-rotavirus SA11-4S was not affected. To confirm these observations, we silenced the expression of cathepsins B, L1, or S by RNAi (Fig. 3A) and the infectivity of the indicated viruses was evaluated (Fig. 3B–D). Although the siRNAs employed only partially silenced the expression of cathepsins, the infectivity of the control virus ReoT1 and rotavirus UK, but not that of RRV, was significantly decreased under these conditions, as compared to cells transfected with an irrelevant siRNA, as previously reported (Diaz-Salinas et al., 2014). In contrast, the infectivity of all four LP-rotavirus strains tested (Wa, WI61, DS-1, and YM) was decreased by 30–75% under these conditions (Fig. 3B–D). The infectivity of EP-rotavirus SA11-4S was not affected by the silencing of neither cathepsin B nor S (Fig. 3B and D, respectively). Interestingly, the infectivity of this rotavirus strain was increased by almost 30% when the expression of cathepsin L1 was silenced (Fig. 3C). Next, we evaluated if transfection of DLPs will surmount the inhibition of infectivity caused by knocking down the expression of the various cathepsins. For this, we evaluated rotavirus strains RRV and UK, as representatives of EP- and LP-rotaviruses. The infectivity of UK was not significantly affected when DLPs were used (Fig. 3E), suggesting that the decreased infectivity of mature virions observed in cells treated with these siRNAs (Fig. 3B–D) was due to a blockage in the cell entry of this rotavirus strain. As expected, the infectivity of transfected RRV DLPs was not decreased; on the contrary, RRV DLP transfection in cells where the expression of either cathepsin B (Fig. 3E, RRV, black bar) or cathepsin S (Fig. 3E, RRV, gray bar) had been silenced, increased by about 30% as compared to control cells treated with an irrelevant siRNA. These results suggest that LP-rotaviruses require cathepsins during cell-entry into MA104 cells, and raise the question whether endo-lysosomal proteases could act as anti-viral factors for EProtaviruses, such as RRV.

3.3. LP-rotaviruses require cathepsins to infect human intestinal cells

Most research on rotavirus cell entry has been carried out in MA104 cells, which are derived from monkey kidney epithelium. Human intestinal Caco-2 cells have also been used to study some rotavirus-cell interactions (López and Arias, 2006), but the vesicular traffic during rotavirus cell entry has not been characterized in this model cell line. It is known that the infectivity of the EP-rotavirus RRV in Caco-2 cells, as well as the LP-rotaviruses Wa and DS-1, depend on several ESCRT components (Silva-Ayala et al., 2013), suggesting that these rotavirus strains follow a vesicular traffic after their

internalization by endocytosis. To investigate if cathepsins are necessary for rotavirus infection of Caco-2 cells, we evaluated the role of these cysteine-proteases on the infectivity of EP-rotaviruses (RRV and SA11-4S) and LP-rotaviruses (UK, Wa and YM) using a pharmacological approach (Fig. 4). ReoT1L was also used as positive control for these assays. As expected, the infectivity of ReoT1L in cells treated with leupeptin (Fig. 4A), as well as with cathepsin B and (Fig. 4B) cathepsin L (Fig. 4C) inhibitors was decreased by about 80%, 40%, and 90% respectively. The infectivity of the EP-rotaviruses RRV and SA11-4S was not affected by treatment with either of the protease inhibitors employed (Fig. 4A–C), in contrast with LP-rotaviruses UK, Wa, and YM, the infectivity of which was decreased by 45%–65% in cells treated with the different endo-lysosomal protease inhibitors (Fig. 4). Interestingly, the infectivity of SA11-4S showed a significant increment of about 30% in cells treated with cathepsin B inhibitor (Fig. 4B). These data suggest that cathepsins are important cell factors for the infectivity of LP-rotaviruses in both MA104 and Caco-2 cells. Altogether, the data presented in this work strongly suggest that LP-rotaviruses require TGN-LE transporters and their cargoes, the cysteine-proteases cathepsins, to infect different cell lines.

4. Discussion

Independently of the nature of the cell surface receptor and the endocytic pathway used for cell internalization, all rotavirus strains evaluated so far seem to converge in EEs during cell entry (Table 1) (Arias et al., 2015). On the other hand, some rotavirus strains enter the cytoplasm from EEs, while most of them traffic to LEs before reaching the cytosol (Diaz-Salinas et al., 2014). The discovery of the need of CDM6PR and cathepsins as important cell factors in the cell entry of the LP-rotavirus strain UK, and the close relationship between the endolysosomal acidic proteases and the CD-M6PR in the maintenance of a correct LE environment (Brulke and Bonifacino, 2009; Coutinho et al., 2012; Chia et al., 2013), encouraged us to investigate whether other TGN-LE transporters, such as CI-M6PR and sortilin-1 could be involved in the infectivity and cell entry of LP-rotaviruses. In this study we have demonstrated that these two transporters are indeed relevant cell factors for the entry of these rotavirus strains, in agreement with the

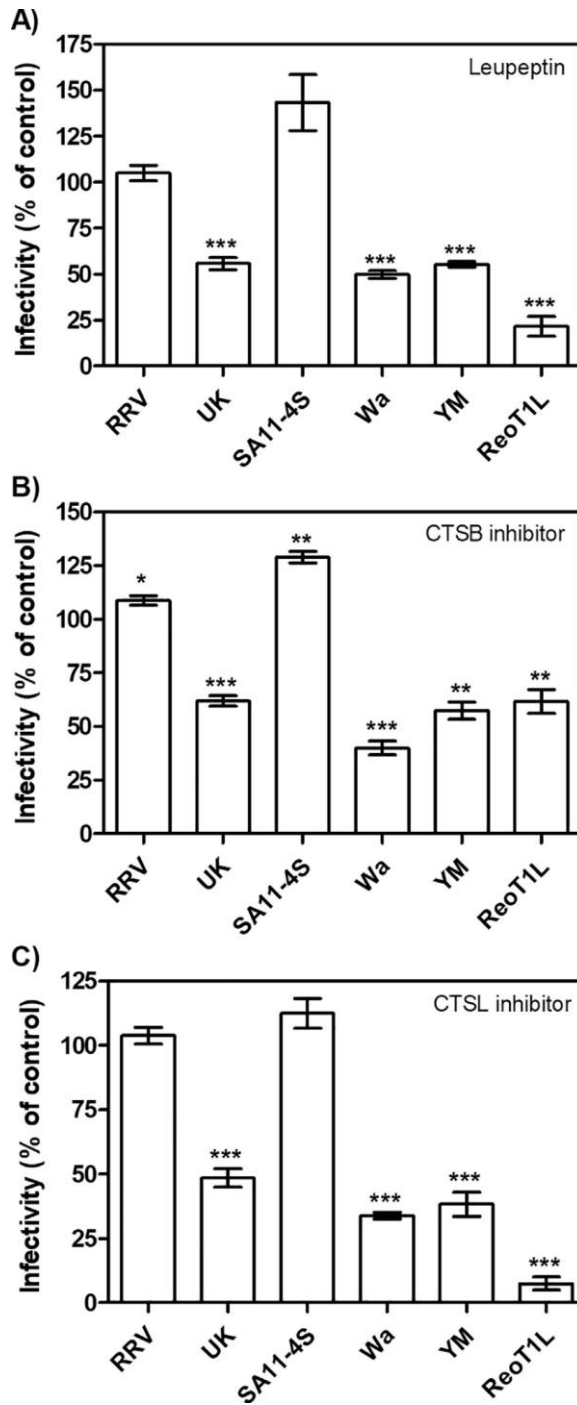


Fig. 4. Effect of protease inhibitors on the infectivity of different rotavirus strains in Caco2 cells. Caco-2 cells were treated or mock-treated with (A) leupeptin, (B) the cathepsin B inhibitor CA-074 or, (C) the cathepsin L inhibitor Z-FF-FMK, and infected with the indicated viruses at an MOI of 0.02. At 14 or 16 hpi (for assays with rotaviruses or reovirus, respectively) cells were fixed and immunostained as described in Section 2.5. Data are expressed as the percent infectivity of each virus compared to the infectivity obtained in mock-treated cells. The arithmetic means \pm SEM of at least two independent experiments performed in duplicate are shown. The asterisks indicate significant differences between the infectivity of each virus in inhibitor-treated cells with respect to mock-treated cells. **, $P < .01$; ***, $P < .001$.

previous observation that CD-M6PR and cathepsins are necessary for UK rotavirus infection in MA104 cells (Diaz-Salinas et al., 2014).

The M6PRs have been shown to be involved in the life-cycle of some non-enveloped viruses. Both CD-M6PR and CI-M6PR have been reported to function as cell receptors during the cell-entry and cell-to-cell spread of the alpha herpesviruses HSV-1 and HSV-2 in Vero cells (Brunetti et al., 1995), as well as in the case of Varicella-Zoster virus (Chen et al., 2004; Finnen et al., 2006; Gabel et al., 1989; Zhu et al., 1995). It has also been documented that CI-M6PR has a role in HIV-1 infection of human and murine microglia, macrophages, and nonmacrophage cells (Suh et al., 2010), and that this transporter is used as cell receptor for HIV-1 to cross the cell blood-brain barrier (Dohgu et al., 2012), favoring virus spread in the central nervous system.

In the case of non-enveloped viruses, we have previously shown that all LP-rotaviruses require CD-M6PR to infect MA104 cells. In the present study, we identify CI-M6PR and sortilin-1 as novel cell factors necessary for the infectivity of most rotavirus strains. It would be interesting to investigate if, besides sortilin-1, the M6PR-independent sorting pathway conformed by the less characterized lysosomal integral membrane protein 2 (LIMP2) (Coutinho et al., 2012), could also be involved in rotavirus infection and/or in the replication of other viruses. We also report that cathepsins, the cargoes that are probably the cause for the requirement of the TGN-LE transporters, are not only needed for the cell-entry of the LP-rotavirus UK, as previously reported (Diaz-Salinas et al., 2014), but they are also required for the cell entry of LP-rotaviruses Wa, WI61, DS-1, and YM, suggesting that these proteases are a general requirement for the infectivity of these rotavirus strains. However, it remains to be determined if these acidic proteases act indirectly, or directly on the virus particle as shown for reovirus (Ebert et al., 2002; Golden et al., 2004). Considering that leupeptin treatment of MA104 and Caco-2 cells significantly decreased the infectivity of LP-rotaviruses (Figs. Figure 2A and Figure 4A), and that sortilin-1 also participates in targeting cathepsins D and H to endo-lysosomes (Canuel et al., 2008; Coutinho et al., 2012), it is possible than other proteases could be involved in the infectivity and cell entry of rotaviruses.

Interestingly, an increase in the infection of the EP-rotavirus strain SA11-4S was observed in cells transfected with siRNAs against cathepsin L1 (Fig. 3C), as well as in cells treated with the cathepsin B inhibitor (Fig. 4B), suggesting a potential role of these cellular molecules as anti-viral factors for this virus strain, and probably for other EProtavirus strains, at a non-identified post-entry step. This observation is supported by the increase in the infectivity of RRV DLPs lipofected in cells where the expression of either CI-M6PR (Fig. 1D, black bars), cathepsin B (Fig. 3E, black bar) or S (Fig. 3E, grey bar) was silenced. Furthermore, we also demonstrated through a pharmacological approach that, unlike EP-rotaviruses, cathepsins have a relevant role in LP-rotaviruses infection in Caco-2 cells, suggesting that these viruses could require them to get access into cells using a conserved mechanism between different cell lines. In this regard, it would be interesting to determine whether these cysteine-proteases could be required for the *in vivo* infection of LP-rotaviruses.

5. Conclusions

Altogether, the data presented in this work strongly suggest that LProtaviruses require TGN-LE transporters and their cargoes cathepsins, to efficiently infect MA104 and Caco-2 cells. These observations open up the possibility for the evaluation of low-toxicity novel inhibitors of cathepsins

to block LP-rotaviruses entry and viral infection, as it has been suggested for other cathepsin-dependent viruses like Ebola virus, and the coronaviruses agents of SARS and MERS (Plebanek et al., 2016; van der Linden et al., 2016; Zhou et al., 2016).

Acknowledgements

We thank Rafaela Espinosa for excellent technical assistance with cell culture and virus growth, and Marco Antonio Espinoza for technical assistance with the qRT-PCR assays. This work was partially supported by DGAPA/UNAM [grant IG200317] and the National Council for Science and Technology-Mexico (CONACYT) [grant 221019]. M.A.D-S. and L.A.C. were recipients of a scholarship from CONACYT.

References

- Arias, C.F., Romero, P., Alvarez, V., López, S., 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* 70 (9), 5832–5839.
- Arias, C.F., Silva-Ayala, D., Lopez, S., 2015. Rotavirus entry: a deep journey into the cell with several exits. *J. Virol.* 89 (2), 890–893.
- Ayala-Breton, C., Arias, M., Espinosa, R., Romero, P., Arias, C.F., Lopez, S., 2009. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J. Virol.* 83 (17), 8819–8831.
- Bass, D.M., Baylor, M.R., Chen, C., Mackow, E.M., Bremont, M., Greenberg, H.B., 1992. Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J. Clin. Invest.* 90 (6), 2313–2320.
- Braulke, T., Bonifacino, J.S., 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (4), 605–614.
- Brunetti, C.R., Burke, R.L., Hoflack, B., Ludwig, T., Dingwell, K.S., Johnson, D.C., 1995. Role of mannose-6-phosphate receptors in herpes simplex virus entry into cells and cell-to-cell transmission. *J. Virol.* 69 (6), 3517–3528.
- Canuel, M., Korkidakis, A., Konnyu, K., Morales, C.R., 2008. Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373 (2), 292–297.
- Chen, J.J., Zhu, Z., Gershon, A.A., Gershon, M.D., 2004. Mannose 6-phosphate receptor dependence of varicella zoster virus infection in vitro and in the epidermis during varicella and zoster. *Cell* 119 (7), 915–926.
- Chia, P.Z., Gunn, P., Gleeson, P.A., 2013. Cargo trafficking between endosomes and the trans-Golgi network. *Histochem. Cell Biol.* 140 (3), 307–315.
- Clark, S.M., Roth, J.R., Clark, M.L., Barnett, B.B., Spendlove, R.S., 1981. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *J. Virol.* 39 (3), 816–822.
- Coulson, B.S., Londrigan, S.L., Lee, D.J., 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (10), 5389–5394.
- Coutinho, M.F., Prata, M.J., Alves, S., 2012. A shortcut to the lysosome: the mannose-6-phosphate-independent pathway. *Mol. Genet. Metab.* 107 (3), 257–266.
- Cuadras, M.A., Arias, C.F., Lopez, S., 1997. Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca²⁺ concentration to initiate their replication cycle. *J. Virol.* 71 (12), 9065–9074.
- Diaz-Salinas, M.A., Romero, P., Espinosa, R., Hoshino, Y., Lopez, S., Arias, C.F., 2013. The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells. *J. Virol.* 87 (3), 1658–1663.
- Diaz-Salinas, M.A., Silva-Ayala, D., Lopez, S., Arias, C.F., 2014. Rotaviruses reach late endosomes and require the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor and the activity of cathepsin proteases to enter the cell. *J. Virol.* 88 (8), 4389–4402.
- Dohgu, S., Ryerse, J.S., Robinson, S.M., Banks, W.A., 2012. Human immunodeficiency virus-1 uses the mannose-6-phosphate receptor to cross the blood-brain barrier. *PLoS One* 7 (6), e39565.
- Dormitzer, P.R., Nason, E.B., Prasad, B.V., Harrison, S.C., 2004. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* 430 (7003), 1053–1058.
- Ebert, D.H., Deussing, J., Peters, C., Dermody, T.S., 2002. Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J. Biol. Chem.* 277 (27), 24609–24617.
- Espejo, R.T., López, S., Arias, C., 1981. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37 (1), 156–160.
- Estes, M.K., Graham, D.Y., Mason, B.B., 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* 39 (3), 879–888.
- Feng, N., Sen, A., Nguyen, H., Vo, P., Hoshino, Y., Deal, E.M., Greenberg, H.B., 2009. Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts. *J. Virol.* 83 (14), 6987–6994.
- Finnen, R.L., Mizokami, K.R., Banfield, B.W., Cai, G.Y., Simpson, S.A., Pizer, L.I., Levin, M.J., 2006. Postentry events are responsible for restriction of productive varicellazoster virus infection in Chinese hamster ovary cells. *J. Virol.* 80 (21), 10325–10334.
- Gabel, C.A., Dubey, L., Steinberg, S.P., Sherman, D., Gershon, M.D., Gershon, A.A., 1989. Varicella-zoster virus glycoprotein oligosaccharides are phosphorylated during posttranslational maturation. *J. Virol.* 63 (10), 4264–4276.
- Ghosh, P., Dahms, N.M., Kornfeld, S., 2003. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (3), 202–212.
- Golden, J.W., Bahe, J.A., Lucas, W.T., Nibert, M.L., Schiff, L.A., 2004. Cathepsin S supports acid-independent infection by some reoviruses. *J. Biol. Chem.* 279 (10), 8547–8557.
- Guerrero, C.A., Méndez, E., Zárate, S., Isa, P., López, S., Arias, C.F., 2000. Integrin alpha (v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (26), 14644–14649.
- Guerrero, C.A., Bouyssouade, D., Zárate, S., Isa, P., López, T., Espinosa, R., Romero, P., Méndez, E., López, S., Arias, C.F., 2002. Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J. Virol.* 76 (8), 4096–4102.
- Gutiérrez, M., Isa, P., Sánchez-San Martín, C., Pérez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C.F., López, S., 2010. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 84 (18), 9161–9169.
- Hu, L., Crawford, S.E., Czako, R., Cortes-Penfield, N.W., Smith, D.F., Le Pendu, J., Estes, M.K., Prasad, B.V., 2012. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* 485 (7397), 256–259.

- Huang, P., Xia, M., Tan, M., Zhong, W., Wei, C., Wang, L., Morrow, A., Jiang, X., 2012. Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J. Virol.* 86 (9), 4833–4843.
- Keljo, D.J., Smith, A.K., 1988. Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 7 (2), 249–256.
- López, S., Arias, C.F., 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12 (6), 271–278.
- López, S., Arias, C.F., 2006. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 309, 39–66.
- López, S., Arias, C.F., Bell, J.R., Strauss, J.H., Espejo, R.T., 1985. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* 144 (1), 11–19.
- Liu, Y., Huang, P., Tan, M., Liu, Y., Biesiada, J., Meller, J., Castello, A.A., Jiang, B., Jiang, X., 2012. Rotavirus VP8*: phylogeny, host range and interaction with HBGAs. *J. Virol.* 86 (18), 9899–9910.
- Martinez, M.A., Lopez, S., Arias, C.F., Isa, P., 2013. Gangliosides have a functional role during rotavirus cell entry. *J. Virol.* 87 (2), 1115–1122.
- Pando, V., Isa, P., Arias, C.F., López, S., 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* 295 (1), 190–200.
- Parashar, U.D., Hummelman, E.G., Bresee, J.S., Miller, M.A., Glass, R.I., 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9 (5), 565–572.
- Plebanek, E., Chevrier, F., Roy, V., Garenne, T., Lecaille, F., Warszycki, D., Bojarski, A.J., Lalmanach, G., Agrofoglio, L.A., 2016. Straightforward synthesis of 2,4,6-trisubstituted 1,3,5-triazine compounds targeting cysteine cathepsins K and S. *Eur. J. Med. Chem.* 121, 12–20.
- Rose, P.P., Bogoy, M., Moses, A.V., Fruh, K., 2007. Insulin-like growth factor II receptor-mediated intracellular retention of cathepsin B is essential for transformation of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 81 (15), 8050–8062.
- Ruiz, A.M., López, I.V., López, S., Espejo, R.T., Arias, C.F., 1988. Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype. *J. Virol.* 62 (11), 4331–4336.
- Sánchez-San Martín, C., López, T., Arias, C.F., López, S., 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* 78 (5), 2310–2318.
- Silva-Ayala, D., Lopez, T., Gutierrez, M., Perrimon, N., Lopez, S., Arias, C.F., 2013. Genome-wide RNAi screen reveals a role for the ESCRT complex in rotavirus cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (25), 10270–10275.
- Suh, H.S., Cosenza-Nashat, M., Choi, N., Zhao, M.L., Li, J.F., Pollard, J.W., Jirtle, R.L., Goldstein, H., Lee, S.C., 2010. Insulin-like growth factor 2 receptor is an IFN γ -inducible microglial protein that facilitates intracellular HIV replication: implications for HIV-induced neurocognitive disorders. *Am. J. Pathol.* 177 (5), 2446–2458.
- Torres-Flores, J.M., Silva-Ayala, D., Espinoza, M.A., Lopez, S., Arias, C.F., 2015. The tight junction protein JAM-A functions as coreceptor for rotavirus entry into MA104 cells. *Virology* 475, 172–178.
- Trask, S.D., Kim, I.S., Harrison, S.C., Dormitzer, P.R., 2010. A rotavirus spike protein conformational intermediate binds lipid bilayers. *J. Virol.* 84 (4), 1764–1770.
- Wolf, M., Vo, P.T., Greenberg, H.B., 2011. Rhesus rotavirus entry into a polarized epithelium is endocytosis dependent and involves sequential VP4 conformational changes. *J. Virol.* 85 (6), 2492–2503.
- Wolf, M., Deal, E.M., Greenberg, H.B., 2012. Rhesus rotavirus trafficking during entry into MA104 cells is restricted to the early endosome compartment. *J. Virol.* 86 (7), 4009–4013.
- Yoder, J.D., Trask, S.D., Vo, T.P., Binka, M., Feng, N., Harrison, S.C., Greenberg, H.B., Dormitzer, P.R., 2009. VP5* rearranges when rotavirus uncoats. *J. Virol.* 83 (21), 11372–11377.
- Zhou, N., Pan, T., Zhang, J., Li, Q., Zhang, X., Bai, C., Huang, F., Peng, T., Zhang, J., Liu, C., Tao, L., Zhang, H., 2016. Glycopeptide antibiotics potently inhibit cathepsin L in the late endosome/lysosome and block the entry of Ebola virus, Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV), and Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus (SARS-CoV). *J. Biol. Chem.* 291 (17), 9218–9232.
- Zhu, Z., Gershon, M.D., Ambron, R., Gabel, C., Gershon, A.A., 1995. Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6-phosphate and heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (8), 3546–3550.
- van der Linden, W.A., Schulze, C.J., Herbert, A.S., Krause, T.B., Wirchnianski, A.A., Dye, J.M., Chandran, K., Bogoy, M., 2016. Cysteine cathepsin inhibitors as anti-Ebola agents. *ACS Infect. Dis.* 2 (3), 173–179.