



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACTÚAN
CON LOS EXTREMOS TERMINALES DEL ARN DE POLARIDAD POSITIVA DE
LOS ASTROVIRUS HUMANOS.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
IBT. EMMANUEL PICHARDO QUINTANA

TUTOR PRINCIPAL

DR. CARLOS SANDOVAL JAIME
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ROSA MARTHA EUGENIA YOCUPICIO MONROY
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA
Instituto de Biotecnología

Cuernavaca, Morelos. Abril, 2023.



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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Carlos Sandoval Jaime y contó con el apoyo del donativo del PAPIIT- IN211421, así como del PRONAI 3 “Infecciones virales del tracto gastrointestinal”, No. de proyecto 302965 de CONACYT. El alumno Emmanuel Pichardo Quintana recibió una beca de CONACYT para realizar sus estudios de maestría, No. de apoyo 788525.

Jurado designado para el examen de grado.

PRESIDENTE. Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

SECRETARIO. Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera

VOCAL. Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá

VOCAL. Dr. Ramón Antonio González García Conde

VOCAL. Dr. Takuya Nishigaki Shimizu

Agradecimientos técnicos

El autor de esta tesis agradece la asesoría y el apoyo técnico proporcionado por los técnicos del laboratorio 5, el M. en C. Marco Antonio Espinoza y la Q.F.B. Rafaela Espinoza durante el desarrollo del presente trabajo, así como a la asistente del laboratorio 5, Nallely Uribe Soriano. A la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBt-UNAM (P. Gaytán Colín, E. López-Bustos, y S. Becerra Ramírez) y el Laboratorio Universitario de Proteómica del IBt-UNAM (E. Meneses Romero).

Índice

Tabla de contenido	
<i>Índice de figuras</i>	6
<i>Abreviaturas</i>	8
<i>Resumen</i>	10
<i>Introducción</i>	11
Clasificación.....	11
Ruta de infección	12
Epidemiología	12
Astrovirus clásicos	12
Astrovirus no clásicos	13
Tropismo de los astrovirus.....	13
Organización genómica	14
Ciclo replicativo de los astrovirus humanos.....	14
Traducción del genoma de los astrovirus humanos.....	15
Replicación del genoma de los astrovirus humanos	16
Importancia de las interacciones ARN-proteína en las infecciones virales	17
Detección de interacciones ARN-proteína (RaPID).....	18
Identificación de RBP en virus de ARN usando el ensayo RaPID	20
Predicción de las RNT de los astrovirus humanos	20
<i>Hipótesis</i>	22
<i>Objetivo general</i>	22
<i>Objetivos particulares</i>	22
<i>Materiales</i>	23
1.- Células.....	23
2.- Vectores	23
3.- Anticuerpos.....	23
4.- Oligonucleótidos de las RNT 5' y 3' del ARN genómico de los astrovirus humanos clásico 8 Yuc-8 y no clásico VA-1.....	23
5.- Oligonucleótidos para PCR de colonia.....	24
<i>Métodos</i>	26

1.- Construcción de los 4 vectores RaPID correspondientes a las RNT de HastV clásico serotipo 8 y HastV no clásico VA1.....	26
1.1.- Hibridación de los oligonucleótidos de las RNT 5' y 3' de astrovirus clásico 8 Yuc-8 y no clásico VA-1.	26
1.2.- Clonación de las RNT 5' y 3' de astrovirus clásico 8 Yuc-8 y no clásico VA-1 en los vectores RaPID.	26
1.3.- Transformación bacteriana de los vectores construidos.....	26
1.4.- PCR de colonia de los vectores construidos.	27
1.5.- Purificación de los vectores RaPID HAstV8-5, HastV8-3, HAstVV1-5 y HAstVV1-3.	27
2.-Transfección del sistema RaPID a células HEK-293T	28
2.1.- Marcaje de proteínas adicionando biotina.	28
2.2.- Colección de pellet de células HEK-293T transfectado con el sistema RaPID.....	28
2.3.- Captura de las proteínas biotiniladas.....	29
2.4.- Purificación de las proteínas biotiniladas.	29
2.5.- Preparación de muestras para la identificación de proteínas por espectrometría de masas.....	29
3.- Ensayos de inmunoprecipitación.....	30
4.- Detección por Western blot de proteínas	30
4.1.- Detección de proteínas biotiniladas.	30
4.2.- Identificación de proteínas inmunoprecipitadas utilizando anticuerpos específicos.	30
5.- Identificación de proteínas por espectrometría de masas y su análisis bioinformático	31
6.- Búsqueda de motivos de unión a RBPs en las RNT de los astrovirus humanos	31
6.1.- Detección de dominios G-quadruplex.....	32
<i>Resultados</i>	33
1.- Presencia de motivos de unión a RBPs en las RNT de astrovirus humano clásico 8 Yuc-8 y astrovirus no clásico VA1.	33
2.- Secuenciación de los vectores HAstV8-5, HastV8-3, HAstVV1-5, HAstVV1-3 y RaPID vacío.....	35
3.- Estandarización de las condiciones de transfección del sistema RaPID en las células HEK- 293T.....	37
4.- Observación de proteínas biotiniladas en presencia de los vectores HAstV8-5', HAstV8-3', HAstVA1-5' y HAstVA1-3'.....	38

5.- Ensayo RaPID-MS en células HEK-293T	39
5.1.- Nucleolina es marcada con biotina durante el ensayo RaPID.....	40
5.2.- Nucleolina es marcada con biotina en la sonda control sin ARN de interés.	43
6.- Las sondas HAstV8-5', HAstV8-3', HAstVA1-5' y HAstVA1-3' interactúan de manera específica con proteínas celulares.	44
6.1.- Las RNT 5' y 3' de los astrovirus clásicos interactúan con 98 proteínas.	45
6.2.- Las RNT 5' y 3' de los astrovirus no clásicos interactúan con 96 proteínas.	47
6.3.- Las RNT de los astrovirus clásicos y no clásicos interactúan con proteínas en común.	49
Discusión	51
Conclusiones	56
Perspectivas	56
Referencias.....	57
Anexo.....	69

Índice de figuras

Figura 1. Relación filogenética de la familia <i>Astroviridae</i>	11
Figura 2.- Organización genómica de la familia <i>Astroviridae</i>	14
Figura 3.- Ciclo replicativo de los astrovirus humanos.....	16
Figura 4.- Ensayo RaPID esquematizado.....	19
Figura 5.- Vectores que componen el sistema RaPID.....	19
Figura 6.- Nomenclatura de estructuras secundarias de ARN.....	20
Figura 7.- Predicción de las RNT 5' y 3' del astrovirus clásico 8.....	33
Figura 8.- Predicción de las RNT 5' y 3' del astrovirus no clásico VA1.....	34
Figura 9.- Posición y secuencia de la región de interés de HastV 8 RNT 5'.....	35
Figura 10.- Posición y secuencia de la región de interés de HastV 8 RNT 3'.....	36
Figura 11.- Posición y secuencia de la región de interés de HastV VA1 RNT 5'.....	36
Figura 12.- Posición y secuencia de la región de interés de HastV VA1 RNT 3'.....	36
Figura 13.- Posición y secuencia de las regiones de las BoxB de RaPID vacío.....	37
Figura 14.- Presencia de proteínas biotiniladas a distintas concentraciones del vector BASU.	38
Figura 15.- Presencia de proteínas biotiniladas para cada una de las construcciones en presencia y en ausencia del segundo vector, BASU.....	39
Figura 16.- Control en proceso del paso 1 al 17 de purificación de las proteínas capturadas en el ensayo RaPID-MS.....	40
Figura 17.- Ensayo de inmunoprecipitación contra nucleolina y GADD34 en el vector correspondiente al astrovirus clásico 8.....	42
Figura 18.- Ensayo de inmunoprecipitación contra nucleolina y GADD34 en el vector correspondiente al astrovirus no clásico VA1.....	43
Figura 19.- Ensayo de inmunoprecipitación contra nucleolina y GADD34 en el vector correspondiente a RaPID vacío.....	44
Figura 20.- Proteínas que interaccionan con las RNT de astrovirus clásico 8.....	45
Figura 21.- Clasificación de las proteínas que interactúan con la RNT 5' de astrovirus clásico 8.....	46

Figura 22.- Clasificación de las proteínas que interactúan con la RNT 3' de astrovirus clásico 8.....	46
Figura 23.- Proteínas que interaccionan con las RNT de astrovirus no clásico VA1.....	47
Figura 24.- Clasificación de las proteínas que interactúan con la RNT 5' de astrovirus no clásico VA1.....	48
Figura 25.- Clasificación de las proteínas que interactúan con la RNT 3' de astrovirus no clásico VA1.....	49
Figura 26.- Comparación de proteínas que interaccionan con la RNT 5' de astrovirus clásico 8 y no clásico VA1.....	50
Figura 27.- Comparación de proteínas que interaccionan con la RNT 3' de astrovirus clásico 8 y no clásico VA1.....	50

Abreviaturas

AMP – Adenosin mono phosphate / Adenosina mono fosfato

ARN – Ácido ribonucleico

ARNsg – ARN subgenómico

BASU – *Bacillus subtilis*

BirA* - Biotina ligasa promiscua

Cs+ - Cadena sencilla de polaridad positiva

CoV – Coronavirus

CO₂ – Dióxido de carbono

dNTP – Deoxynucleotide triphosphate / Desoxinucleótido trifosfato

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid / Ácido etilendiaminotetraacético

eGFP – Enhanced green fluorescent protein / Proteína verde fluorescente mejorada

EMBL-EBI – European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute / Laboratorio europeo de biología molecular – Instituto europeo de bioinformática.

HAstV – Astrovirus humanos

HEK-293T – Células 293 de riñón de embrión humano

HMO – Human, Mink, Ovine / Humano, Mink, Ovino

hnRNP – Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein / Ribonucleoproteína nuclear heterogénea.

LB – Lysogeny broth / Caldo de lisogenia

MgCl₂ – Cloruro de magnesio

MLB – Melbourne

NFAR – Nuclear factor associated with double strain RNA / Factor nuclear asociado a ARN de doble cadena

ORF – Open ready frame / Marco abierto de lectura

pBR322 – Plásmido Bolívar – Rodríguez 322

PBS – Phosphate-buffered saline / Tampón salino de fosfatos

PCR – Polymerase chain reaction / Reacción en cadena de la polimerasa

PTB – Polypyrimidine tract-binding protein / Proteína de unión al tracto de polipirimidina

RaPID – RNA–protein interaction detection / Detección de interacciones ARN-proteína

RBP – RNA binding protein / Proteína de unión a ARN

RNT – Regiones no traducidas

RPM – Revoluciones por minuto

RT-PCR – Reverse transcription – polymerase chain reaction / Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa

SARS – Severe acute respiratory síndrome / Síndrome severo agudo respiratorio

SNC - Sistema nervioso central

VA – Virginia

Resumen

La replicación de virus de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva (cs+) involucra la participación de complejos de interacción ARN-proteína; muchas de estas interacciones ocurren en las regiones no traducidas (o RNT) de los extremos 5' y 3', las cuales desempeñan funciones reguladoras esenciales en la replicación del virus. A la fecha existe poca información acerca del ciclo replicativo de los astrovirus y las proteínas del huésped que secuestra durante la infección por astrovirus humanos (HAstV) [De Nova-Ocampo *et al*, 2019, Monceyron C., *et al*, 1997].

En este trabajo se analizaron las interacciones ARN-proteína de las RNT 5' y 3' del HAstV clásico serotipo 8 y el HAstV no clásico VA1. Ambos astrovirus son de relevancia epidemiológica [Hargest V., *et al*, 2021; Kapoor A., *et al*, 2009; Méndez-Toss M., *et al*, 2000]. Se sugiere en la literatura que ambos pudiesen tener distintos mecanismos celulares y moleculares [Hargest V., *et al*, 2021]. Para este análisis se utilizó el ensayo RaPID, (por sus siglas en inglés, *RNA-protein interaction detection*). Para la realización del ensayo se construyeron vectores que contenían las RNT de los HAstV previamente mencionados. Este ensayo permitió de manera selectiva marcar con biotina y capturar por afinidad las proteínas que interactúan con las RNT de interés que se encuentran clonadas en el vector principal del ensayo, lo cual fue comprobado mediante la caracterización del sistema para estos ensayos, observando la captura y marcaje de proteínas con propiedades de unión a ARN descritas y la captura sin marcaje para proteínas que se conoce que no tienen dichas propiedades.

Los resultados de la identificación muestran que el ensayo RaPID permitió identificar 194 proteínas. De las 194 proteínas identificadas, el 82% están reportadas como proteínas de unión a ARN. Del total identificado, 98 proteínas se encontraron interactuando con las RNT del HAstV clásico serotipo 8. Así mismo 96 proteínas se encontraron interactuando con las RNT del HAstV no clásico VA1. Al comparar las proteínas que interactúan con ambos tipos de astrovirus se encontraron 3 proteínas que interactuaban en ambas RNT de los dos virus analizados: DDX5, PCBP y SRSF5; todas ellas reportadas en la literatura en interacciones con RNT de otros virus de ARN. También se identificó una proteína que interactúa en 3 de las 4 RNT analizadas: PTBP1, la cuál ha sido reportada en otros ciclos replicativos de virus de ARN, incluido el astrovirus humanos clásico 8 [De Nova-Ocampo *et al*, 2019]. De las proteínas diferenciales que interactúan con el HAstV clásico serotipo 8 se encontró a la proteína DDX23, previamente reportada en nuestro grupo de investigación [Murillo A., *et al*. 2015]. Adicionalmente a la identificación por espectrometría de masas, se encontraron de manera bioinformática posibles sitios que han sido reportados para la unión de estas proteínas al ARN viral, sustentando nuestros hallazgos.

La identificación de proteínas de unión a las RNT de los dos diferentes tipos de astrovirus, clásicos y no clásicos, sugieren la existencia de semejanzas y diferencias en las estrategias replicativas de los astrovirus.

Desde su descubrimiento en 1975 hasta el año 2008 se conocía una familia de 8 integrantes de HAstV, clasificados como serotipos 1 al 8 y denominados clásicos. Después, en 2008 se identificaron 10 nuevos integrantes, VA1-VA5, BF34, MLB1-3, Pune, denominados HAstV no clásicos, siendo de interés los integrantes denominados Virginia (VA) o también llamados HMO, por sus siglas en inglés para humanos, minks y ovinos, debido a que están relacionados a esas especies [Hargest V., et al, 2021, Janowski A, 2021]. Aunque recientemente se han sumado astrovirus porcinos y bovinos [Reuter G., et al. 2018], y estos están asociados con casos de afectaciones a sistema nervioso central (SNC) en humanos y animales, se sugiere que tienen distintos mecanismos celulares y moleculares en comparación con los astrovirus clásicos [Hargest V., et al, 2021].

Ruta de infección

La ruta de infección de los astrovirus se lleva a través de la ruta fecal-oral, el contacto entre personas, el consumo de alimentos y agua contaminados con heces y a través de superficies contaminadas. Los brotes ocurren principalmente en ambientes semi-cerrados como escuelas, hospitales pediátricos, guarderías y centros de atención para ancianos [Aktas O., et al, 2019; Siqueira J., et al, 2017].

Epidemiología

Astrovirus clásicos

Se estima que los HAstV clásicos son responsables de entre el 2% y el 9% de todas las diarreas agudas no bacterianas en los niños. El rango de edad donde ocurre la incidencia de la infección es desde recién nacidos hasta los 5 años; el 90% de los niños de 5 años en adelante tienen anticuerpos séricos detectables [Bosch A., et al, 2014]. Aunque tiende a haber un patrón estacional con mayor incidencia en invierno, posiblemente debido a una mayor estabilidad en temperaturas más frías. Los astrovirus circulan durante todo el año [Hargest V., et al, 2021].

Reportes de 2013 indican que la incidencia promedio de infección por HAstV fue del 11% en todo el mundo y tiende a ser mayor en los países en vías de desarrollo, probablemente debido a prácticas de higiene y tratamiento del agua deficientes. Las estadísticas de infección por astrovirus se encuentran muy limitadas por el subregistro y las infecciones asintomáticas. Sin embargo, el desarrollo de pruebas por RT-PCR en tiempo real, una técnica más sensible comparado con los inmunoensayos enzimáticos; lo que ha permitido detectar tasas significativamente más altas de infecciones por HAstV en niños asintomáticos; con estos nuevos métodos de detección, se cree que la tasa de muestras positivas para HAstV de niños asintomáticos es aproximadamente del 4% [Bosch A., et al, 2014].

De los genotipos clásicos, HAstV1 es el más frecuente en el mundo, con excepción de México donde domina HAstV clásico 2. En el año 2000 un estudio multicéntrico reportó en Mérida, Yucatán, la presencia del HAstV clásico 8, lo que sugiere que esta cepa podría ser relevante desde el punto de vista epidemiológico [Méndez-Toss M., et al, 2000].

La incidencia a nivel mundial por infección de HAstV clásicos ha ido disminuyendo en las últimas tres décadas, del 22% en la década de los 80 a solo el 5% en los 2000. Esto podría

deberse a que los HAstV no clásicos superan a los genotipos clásicos, ya que hay informes que han demostrado que su prevalencia está aumentando [Hargest V., *et al.* 2021].

Astrovirus no clásicos

Con respecto a los denominados HAstV no clásicos, la asociación con cuadros de gastroenteritis relacionada a HAstV VA y MLB es todavía ambigua en comparación con los HAstV clásicos, lo que dificulta la elaboración de diagnósticos precisos [Hargest V., *et al.* 2021]. Estudios de seroprevalencia en adultos estadounidenses sugieren exposiciones de alrededor del 86% a MLB1 y VA1 en al menos el 65% de los individuos, lo que indica que una gran parte de la población ha estado en contacto con ellos [Burbelo P., *et al.* 2011]. A diferencia de los HAstV clásicos, la asociación de cepas VA con gastroenteritis no está resuelta, sin embargo, VA1 se ha relacionado en diversas ocasiones con infecciones al Sistema Nervioso Central (SNC) en humanos [Brown J., *et al.* 2015].

Tropismo de los astrovirus

La gran mayoría de los genomas de astrovirus se han identificado a partir de muestras procedentes del tracto gastrointestinal del huésped [Midthun, K., *et al.* 1993]. Se ha sugerido que esto podría deberse en parte al sesgo de muestreo y sugeriría que muchos astrovirus tienen un tropismo gastrointestinal [Mattison, C., *et al.* 2021]. Actualmente, los determinantes genéticos que afectan al tropismo tisular de los astrovirus siguen siendo desconocidos, tanto desde la perspectiva del huésped como del virus [Janowski A, 2021]. Los receptores del huésped por los que los astrovirus acceden a la célula no están definidos, por lo que no se puede estudiar el espectro de células potencialmente infectables en función de la expresión del receptor [Wohlgemuth N., *et al.* 2019]. Se ha descrito una limitada cantidad de interacciones entre el huésped y el virus, pero los factores esenciales durante la replicación viral aún no han sido descritos [De Nova-Ocampo M., *et al.* 2019; Janowski A, 2021; Monceyron C., *et al.* 1997; Murillo A., *et al.* 2015].

Se sabe que los HAstV clásicos, requieren incubación con tripsina para su propagación en cultivo celular [Lee, T. y Kurtz, J. 1981]. La tripsina se produce en mayor cantidad en el tracto gastrointestinal, lo que proporcionaría una explicación de por qué la mayoría de las infecciones ocurren en ese órgano. No obstante, hay dos reportes de encefalitis en humanos causado por el astrovirus clásico 4 y en un caso, el virus se detectó en múltiples tejidos fuera del tracto gastrointestinal, lo que plantea la posibilidad de que la tripsina derivada del cerebro o proteasas adicionales pudieran ser suficientes para iniciar la infección viral [Wunderli W., *et al.* 2011]. Por el contrario, algunos astrovirus no requieren tripsina para su propagación en cultivo celular y se sabe que infectan tejidos fuera del tracto gastrointestinal, incluidos el astrovirus VA1 [Janowski A., *et al.* 2017] y el virus de la nefritis aviar (también perteneciente a la familia de astrovirus) [Imada, T., *et al.* 2000]. Se ha detectado la presencia de VA1 en múltiples tejidos, incluidos el tracto gastrointestinal, el cerebro, el suero y la nasofaringe [Cordey, S., *et al.* 2016], y se puede propagar en astrocitos primarios en cultivo celular sin la ayuda de tripsina [Janowski A., *et al.* 2017]. Por lo que se sugiere que la presencia o falta de tripsina del huésped podría desempeñar un papel importante en el ciclo replicativo de los astrovirus y en la determinación del espectro de enfermedades asociadas con un genotipo en particular [Janowski A, 2021].

Los astrovirus que infectan becerros [Snodgrass D., *et al*, 1979], murciélagos [Fischer K., *et al*, 2017], lechones [Rawal G., *et al*, 2020] y gatitos [Hoshino Y., *et al*, 1981] se detectan con frecuencia en el tracto gastrointestinal y no causan síntomas de la enfermedad en comparación con los ejemplares adultos, lo que sugiere que el tracto gastrointestinal puede ser un sitio importante de infección y transmisión asintomática, por lo que representa un órgano importante para la diseminación del virus a otros órganos. Reforzando la idea que pueden tener diferencias celulares y moleculares en las primeras etapas del desarrollo en estos animales [Janowski A, 2021].

Organización genómica

El genoma de astrovirus es un ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de entre 6.2 y 7.7 kb de longitud, y posee tres marcos abiertos de lectura (ORF), denominados ORF1a, ORF1b y ORF2. El ARN viral se encuentra flanqueado por RNT en ambos extremos, denominadas RNT 5' y 3'. En el extremo 5' posee una proteína viral ligada al genoma (VPg) y el extremo 3' se encuentra poliadenilado [Méndez E. *et al*, 2012]. La organización estructural del ARN genómico puede observarse en la figura 2.

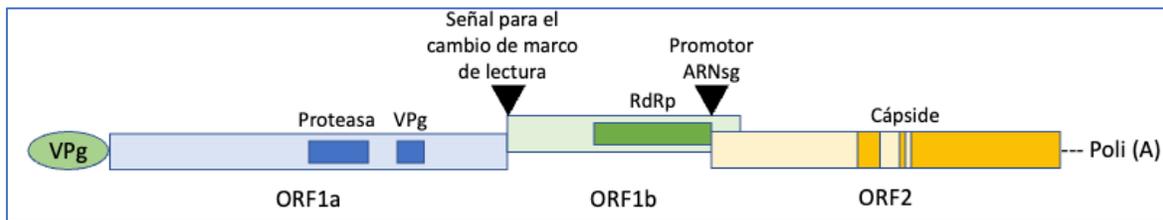


Figura 2.- Organización genómica de la familia *Astroviridae*. El ARN viral se compone de 3 ORF, representado en cajas. Dentro de cada ORF se muestran las proteínas que codifica cada uno de ellos, adicionalmente se muestra la señal del salto del ribosoma y el sitio de inicio de la transcripción del ARN subgenómico. La descripción detallada se encuentra descrita más adelante en el texto. Adaptado de [Hargest V., *et al*, 2021].

Los HAstV son parásitos intracelulares obligados que dependen de la maquinaria celular para la traducción de sus proteínas y la replicación de su genoma. La mayoría de las funciones del genoma viral no sólo están codificadas en el marco abierto de lectura, sino también en las RNT [Jiang H., *et al*, 2013].

Para los virus de ARN, como los astrovirus, la replicación y la traducción están altamente regulados. Ambos procesos se llevan a cabo mediante la interacción entre los factores del hospedero y los factores virales con la composición de nucleótidos y estructuras secundarias que conforman las RNT [Jiang H., *et al*, 2013; Monceyron C., *et al*, 1997].

Ciclo replicativo de los astrovirus humanos

La información existente acerca del ciclo replicativo se basa en el estudio de los astrovirus humanos clásicos y se infiere que este ciclo sea muy parecido al de otros virus de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva, como los miembros de las familias *Togaviridae* y *Caliciviridae* [Hargest V., *et al*, 2021]. Aunque aún se desconoce el receptor de entrada a la célula [Wohlgemuth N., *et al*, 2019]. Los astrovirus clásicos requieren de un procesamiento con tripsina que genera tres productos; VP34, un dominio proteico conservado y que conforma a la nucleocápside. VP25 y VP27 que son el objetivo de anticuerpos dirigidos

contra las espículas del virión [Méndez E. *et al*, 2012]. Los astrovirus se internalizan en la célula a través de endocitosis mediada por clatrininas [Méndez E. *et al*, 2012]. Las vesículas provenientes de la vía de las clatrininas se transforman en endosomas tardíos y se postula que el entorno ácido que proporcionan es importante en la liberación y desempaquetamiento del material genético al interior de la célula [Donelli G., *et al*, 1992]. También se ha propuesto que la entrada puede ocurrir por un mecanismo desconocido que activa la vía ERK1/2 [Moser L. y Schultz-Cherry S., 2008].

Traducción del genoma de los astrovirus humanos

Una vez que se libera el material genético dentro de la célula, este es traducido a dos poliproteínas, nsp1a de ~101 kDa y nsp1ab de ~160 kDa [Jiang B. *et al*, 1993]. La traducción del ORF1a produce la proteína nsp1a y se detiene en un codón sobrelapado, resultado de la unión del ORF1a y el ORF1b, generando un salto del ribosoma un nucleótido hacia atrás, cambiando de ORF y produciendo una nueva poliproteína, nsp1ab y la cual se sabe que en condiciones *in vivo* puede traducirse hasta en un 25%. Este salto es un mecanismo para la traducción atenuada y es común en los virus de ARN de sentido positivo [Jiang B. *et al*, 1993]. Las dos poliproteínas se cortan por acción de la proteasa viral [Gibson C. *et al*, 1998] y se generan las proteínas no estructurales, que no han sido completamente caracterizadas. Se postula que se producen 5 proteínas no estructurales. (1) Una proteína de 20 kDa la cual se predice que contiene un dominio transmembranal y un dominio del tipo coiled-coil [Méndez E. *et al*, 2003]; (2) Una proteína que se predice contiene cuatro dominios transmembranales, aunque no se ha identificado su secuencia en la poliproteína nsp1a [Méndez E. *et al*, 2003]; (3) Una serin-proteasa viral de 27 kDa [Kiang D. y Matsui S. 2002]; (4) Una fosfoproteína de 21–27 kDa dependiendo de su nivel de fosforilación o procesamiento que contiene la región hipervariable de nsp1a y posiblemente sea la proteína VPg [Fuentes C. *et al*, 2011]; (5) Una ARN polimerasa dependiente de ARN (*RdRp*, de sus siglas en inglés) de 57 kDa [Lewis T. *et al*, 1994]. Adicionalmente se han reportado dos productos más de 5.5 y 6.5 kDa que probablemente estén ligados a nsp1a [Willcocks M. *et al*, 1999].

El genoma de los astrovirus tiene unida al extremo 5' una proteína del tipo VPg -en lugar de una estructura cap, la cual le permite reclutar a la proteína eIF4E para iniciar la traducción [Méndez E. *et al*, 2012]. En el caso de los calicivirus, la proteína VPg interacciona con las proteínas eIF4E y eIF3, y forma un complejo para iniciar la traducción [Fuentes C. *et al*, 2011].

En células Caco-2 infectadas con astrovirus clásico 8, el producto del ORF2 es una poliproteína de 87 a 90 kDa sintetizada a partir de un ARN subgenómico (ARNsg) viral [Herbert T. *et al*, 1997] que da origen a la proteína de la cápside o VP90, de 90 kDa. VP90 es cortada por caspasas para dar origen a una proteína de 70 kDa, denominada VP70. La transición de VP90 a VP70 está asociada a la salida del virus de la célula. Para tener actividad infecciosa, a partícula VP70 requiere ser activada con tripsina, generándose tres productos: VP25, VP27 y VP34 [Arias C y DuBois R. 2017]. Las partículas de VP90 del astrovirus humano VA1 tratadas sin tripsina pueden ser infecciosas [Aguilera-Flores C. *et al*, 2022; Janowski A., *et al*. 2017].

Replicación del genoma de los astrovirus humanos

Tras la traducción del ARN viral y el procesamiento proteolítico de las proteínas no estructurales, se forma un complejo de replicación viral, en donde, a partir del ARN viral se produce un ARN de sentido negativo que se detecta de 6 a 12 horas después de la infección [Jang S. *et al*, 2010]. En el caso de los astrovirus, se ha demostrado que la proteína no estructural nsp1a/4, procesada a partir de la poliproteína nsp1a, en conjunto con la replicasa viral (*RdRp*, por sus siglas en inglés RNA dependant RNA polimerase) es necesaria para la replicación del genoma viral. Se desconoce si otras proteínas no estructurales participan en este proceso [Fuentes C. *et al*, 2011]. Por otra parte, la generación de ARNs de sentido negativo a partir de ARN genómico y subgenómico (ARNsg) se detecta a partir de las 8 h posteriores a la infección [Méndez E. *et al*, 2012]. El ARNsg se transcribe en una cantidad estimada diez veces mayor que el genoma viral a las 12 h posteriores a la infección [Monroe S., *et al*, 1991].

Como se describió en la sección anterior, un salto del ribosoma hacia atrás genera un ARNsg que se transcribe para dar origen a proteínas estructurales y se sabe que la transcripción de grandes cantidades de ARNsg es común en los virus de ARN de polaridad positiva, por lo que se ha sugerido que es un mecanismo para reprimir la traducción del huésped y que posiblemente promueve el empaquetamiento en los viriones con los genomas virales recién sintetizados [Sztuba-Solińska J. *et al*, 2011]. Adicionalmente hay poca información acerca de las proteínas específicas del huésped involucradas en la replicación del genoma del astrovirus, que podría requerir varias de ellas, tal como se ha reportado para otros virus de ARN de cadena positiva [Cristea I. *et al*, 2006; Liu Y., *et al*, 2010]. El proceso de replicación y traducción propuesto para los HAsTV y descrito anteriormente en el texto puede observarse en la figura 3.

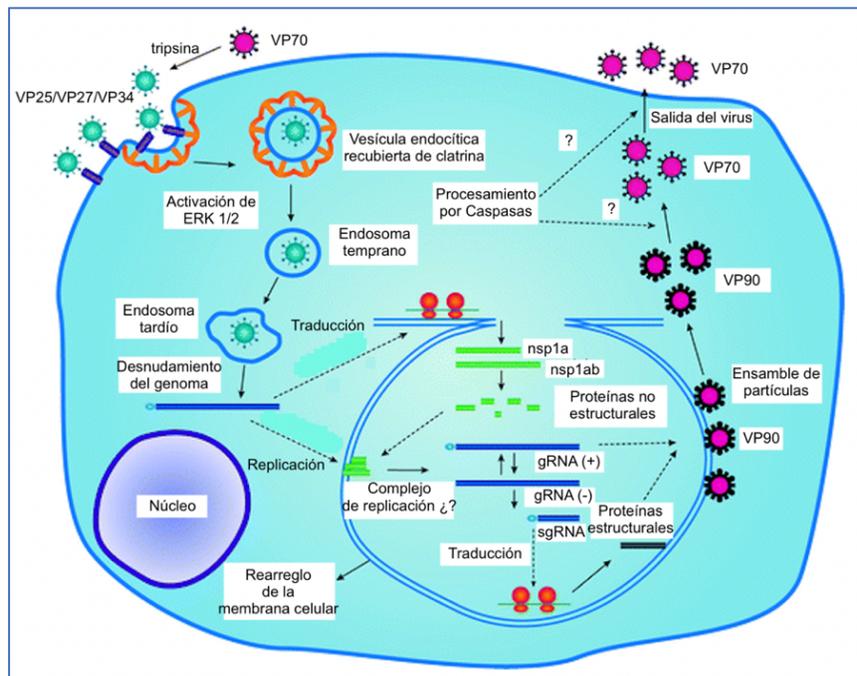


Figura 3.- Ciclo replicativo de los astrovirus humanos, adaptado de [Méndez E. *et al*, 2012] la descripción detallada se encuentra descrita en el texto.

Importancia de las interacciones ARN-proteína en las infecciones virales

Las interacciones ARN-proteína son relevantes en el metabolismo del ARN y tienen un papel fundamental en la regulación de la función celular; incluso existen reportes recientes que revelan varias redes de interacciones ARN-proteína que regulan la estabilidad genómica, la señalización celular y la expresión génica en humanos [Ramanathan M., *et al*, 2018].

Las RNT de los extremos 5' y 3' de los genomas virales de ARN desempeñan funciones reguladoras esenciales en la replicación y traducción del genoma [Verma R., *et al*, 2021]. Estas se llevan a cabo mediante su interacción con proteínas secuestradas del huésped, también conocidas como proteínas de unión al ARN (o *RBP*, por sus siglas en inglés RNA Binding Proteins) [Li Z. y Nagy P., 2011; Rangan R., *et al*, 2020; Verma R., *et al*, 2021].

Algunas de las RBP que participan en la replicación viral son la proteína de unión a tractos de polipirimidinas 1 (PTBP1) y la ribonucleoproteína heterogéneo nuclear A1 (hnRNP A1), que se ha reportado que interaccionan con los extremos 5' y 3' del ARN del virus de la hepatitis de ratón, y tienen un papel muy relevante en la replicación del ARN [Huang Y. y Lai C. 2001].

De igual forma se han identificado algunas RBP asociadas al proceso de traducción; se ha reportado que durante la replicación del virus de la hepatitis A, la proteína de unión a policitosinas del tipo 2 (PCBP2), PTBP1, las proteínas La y GADPH se unen a la estructura IRES presente en el extremo 5' para regular de manera positiva o negativa la producción de las proteínas virales [McKnight K. y Lemon S. 2018]. También las proteínas PTBP1 y NONO se han reportado que están involucradas en el proceso de traducción del ARN de poliovirus, lo que a su vez sugiere la utilización de proteínas celulares comunes que reclutan los virus de ARN de polaridad positiva para llevar a cabo una traducción y replicación de su ARN [Viktorovskaya O, *et al*, 2016].

Un dato interesante, es que las proteínas celulares que participan en estos procesos son tanto citoplásmicas como nucleares. Por ejemplo, NONO y sus proteínas accesorias de unión, predominantemente nucleares, se unen al ARN del virus dengue y cumplen funciones de procesamiento, empalme y transporte de ARN, así como en la activación y represión transcripcional durante la infección [Viktorovskaya O, *et al*, 2016].

Otras RBP participan en el ensamblaje de los complejos de replicación, tal es el caso del grupo de proteínas NFAR que estabilizan y forman un complejo ribonucleoproteico durante la infección con virus de la diarrea viral bovina [Isken O., *et al*. 2006] y el virus de la hepatitis C [Isken O., *et al*. 2007]. Incluso se han descrito RBPs que tienen funciones especializadas, tal es el caso del reclutamiento y translocación de las hnRNP en la infección de rotavirus, donde éstas también tienen un papel en la translocación de proteínas nucleares al citoplasma con ayuda de las proteínas virales NSP2 y NSP5, promoviendo la rápida replicación del virus [Dhillon P., *et al*, 2018].

De Nova-Ocampo y colaboradores en 2019 mediante el uso de la técnica bioquímica de entrecruzamiento con luz ultravioleta, identificaron a las proteínas PTBP1 y PCBP2 interactuando con las RNT 5' y 3' del HAstV clásico serotipo 8. Los autores postulan que podrían estar implicadas en el proceso de replicación viral [De Nova-Ocampo M., *et al*, 2019]. De Nova-Ocampo también predice utilizando bioinformática, que pueden existir sitios de unión en el ARN viral hnRNPs, las cuales, en conjunto con PTBP1, se han reportado involucradas en funciones del metabolismo del ARN, la poliadenilación, la formación del extremo 3', la traducción del ARN, la localización del ARN y su estabilidad [De Nova-Ocampo M., *et al*, 2019; Ferreira F., *et al*, 2021].

Recientemente se ha descrito para los astrovirus porcinos del genotipo 1 al 5, que la RNT 5' se encuentra altamente conservada en secuencia y estructura secundaria, lo que sugiere que está implicada en la regulación del ciclo viral. Incluso mediante ensayos de predicciones de estructura, se ha descrito que el ARN del astrovirus porcino 3 tiene motivos conservados en la RNT 3' que son análogos a los presentes en la RNT 3' de astrovirus humanos. Ambas RNT 3' contienen las secuencias: CCAA, UGGU y GGCC, en las posiciones 1, 19 y 25, respectivamente [De Nova-Ocampo *et al*, 2019; Ferreira F., *et al*, 2021]. Cabe resaltar que estos motivos no corresponden a una región homóloga, dado que se encuentran en una posición distinta a donde se postula que se unen algunas RBPs, tales como PTBP1, SRSF2, SRSF5 y SRSF6 en los astrovirus humanos [Ferreira F., *et al*, 2021]. Es posible que esta diferencia sea una razón por la que estos virus porcinos no pueden replicarse en cultivos celulares de origen humano, aunque su RNT 3' se conserva moderadamente entre los astrovirus porcinos, presenta conformaciones estructurales alternativas que incluyen múltiples sitios de unión a proteínas como PTBP1, hnRNPE2 y SRSF5, esto de acuerdo con análisis bioinformáticos [Ferreira F., *et al*, 2021].

Detección de interacciones ARN-proteína (RaPID)

El ensayo RaPID (mostrado en la figura 4), es uno de los ensayos utilizados para detectar las uniones entre las proteínas celulares y el ARN viral. Utiliza una proteína biotín ligasa, también llamada BirA*, que convierte la biotina en un intermediario de biotina reactiva que se libera de la enzima para marcar covalentemente cualquier residuo cercano y expuesto de lisina [Ramanathan M., *et al*, 2018]. Esto crea un radio de biotilación de 10 nm alrededor de la biotín ligasa, por lo que las lisinas que se encuentran dentro de este radio serán biotinizadas [Ramanathan M., *et al*, 2018]. La BirA* se encuentra fusionada a la proteína λ -N (lambda-N) y a su vez ambas están clonadas en el vector llamado BASU (mostrado en la figura 5B). El segundo vector del ensayo RaPID, denominado "RNA motif plasmid cloning backbone" (o vector RaPID Addgene, mostrado en la figura 5A), es usado para clonar una secuencia de ARN de interés en la posición que se encuentra una región irrelevante. Ambos vectores cuentan con orígenes de replicación SV40 y un promotor de citomegalovirus humano (CMV). La secuencia de interés va a estar flanqueada por 3 secuencias de ARN conocidas como BoxB, que son reconocidas por la proteína λ -N fusionada a la biotín ligasa, por lo tanto, se crea un radio de biotilación alrededor de la estructura de la secuencia de interés clonada, marcando a las proteínas que interactúan con ella. Para que se lleve a cabo esta biotilación es necesario suplementar el medio de cultivo con biotina. Las proteínas biotinizadas son purificadas por afinidad a estreptavidina.

Una vez llevada a cabo su separación, estas se analizan e identifican por espectrometría de masas [Ramanathan M., *et al*, 2018].

Esta técnica aprovecha la ventaja de que la secuencia de interés clonada en el vector “RNA motif plasmid cloning backbone” transcribe una sonda que adopta una conformación estructural en el entorno celular, por lo que las interacciones ARN-Proteína ocurren bajo condiciones nativas intracelulares, que representan una ventaja frente de las técnicas bioquímicas como ARN-MaP y ARN-compete [Ramanathan M., *et al*, 2019].

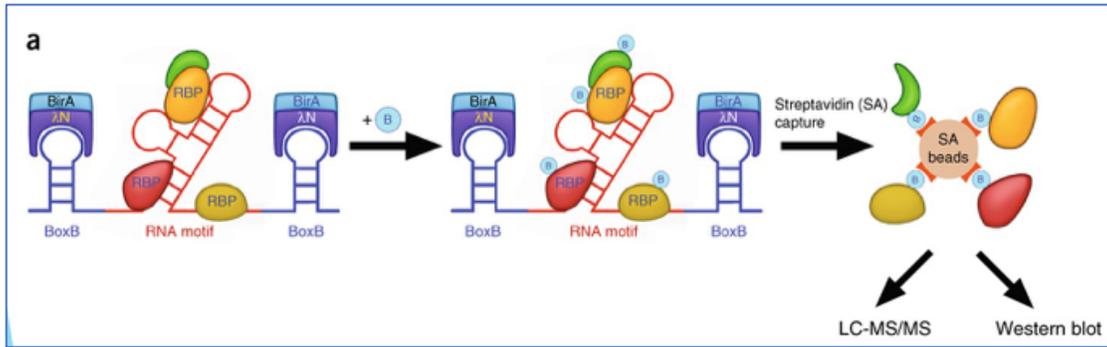


Figura 4.- Ensayo RaPID esquematizado. Las estructuras tallo asa del ARN, denominadas BoxB (azul) flanquean la secuencia de ARN de interés (rojo). La unión de la proteína de fusión RaPID (λN-BirA*) a los sitios BoxB induce la biotinylation de proteínas en la proximidad, las cuales interactúan con la secuencia de ARN de interés. Las microesferas acopladas a estreptavidina capturan las proteínas biotiniladas por afinidad y permiten aislarlas para analizarlas por diversas técnicas. Figura tomada de Ramanathan M., *et al*, 2018.

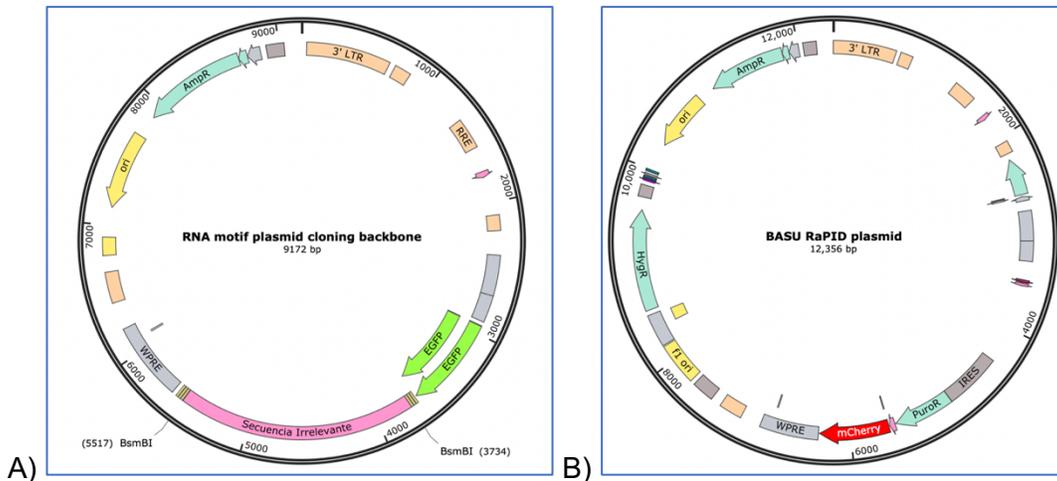


Figura 5.- Vectores que componen el sistema RaPID. A) Vector de expresión “RNA motif plasmid cloning backbone” Se muestra en color rosa la secuencia irrelevante que puede sustituirse para insertar una secuencia de interés, en color amarillo y flanqueando la región de la secuencia irrelevante se observan las BoxB. Figura tomada de Addgene (<https://www.addgene.org/107253/>). Y B) vector de expresión “BASU RaPID plasmid”. Figura tomada de Addgene (<https://www.addgene.org/107250/>).

Identificación de RBP en virus de ARN usando el ensayo RaPID

El ensayo RaPID complementado con la técnica de espectrometría de masas se ha utilizado previamente para identificar a proteínas de unión a ARN que interactúan con las RNT de otros virus, tal como el virus del Zika [[Ramanathan M., et al, 2018](#)], el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 [[Verma R., et al, 2021](#)] y Dengue virus [[Shivaprasad S., et al, 2022](#)]. El estudio de SARS-CoV-2, tuvo resultados muy similares a otros dos estudios independientes, que de igual forma buscaban determinar las RBP que interactúan con las RNT del SARS-CoV-2, donde utilizaron de las técnicas bioquímicas de RAP-MS [[Flynn R., et al, 2021](#)] y ChIRP-MS [[Schmidt N, et al, 2021](#)]. Se compararon los tres estudios y se encontraron identificadas proteínas en común en los 3 estudios [[Verma R., et al, 2021](#)], mostrando así la robustez y especificidad del ensayo RaPID comparado con dos técnicas rutinarias para la identificación de proteínas de unión a ARN.

Predicción de las RNT de los astrovirus humanos

Las predicciones de las estructuras secundarias de ARN pueden ayudar a estudiar las funciones de los ARN no codificantes (ARNnc). Entre las funciones de los ARNnc se incluyen la regulación transcripcional y la modificación del ARN. Debido a que las funciones de los ARNnc están profundamente relacionadas con sus estructuras más que con sus secuencias primarias, la elucidación de las estructuras de los ARNnc nos permite ayudar a comprender sus funciones [[Sato K. et al. 2021](#)].

Es importante resaltar que la mayoría de las estructuras secundarias cuentan con pares no canónicos o apareamientos no-Watson-Crick del tipo G-U, G-A y U-U, que son clave en el establecimiento de interacciones de ARN-ARN o ARN-Proteína, proporcionando sitios de reconocimiento en la síntesis de proteínas o alguna otra función regulatoria [[Nagaswamy U, et al, 2002](#); [Varani G. y McClain W, 2000](#)]. Estos pares no canónicos distorsionan la estructura regular permitiendo el contacto con el dominio de las proteínas, además proporcionan grupos donadores y aceptores de electrones para el contacto intermolecular con aminoácidos [[Nagaswamy U, et al, 2002](#)].

Una estructura secundaria de ARN está compuesta por varias subestructuras características, llamadas asas, tallos-asas, asas internas o burbujas, asas abultadas, apilamientos de pares de bases, asas ramificadas, asas externas, entre otras. La figura 6 ejemplifica algunas subestructuras comunes [[Sato K. et al. 2021](#); [Zuker M. 2003](#)].

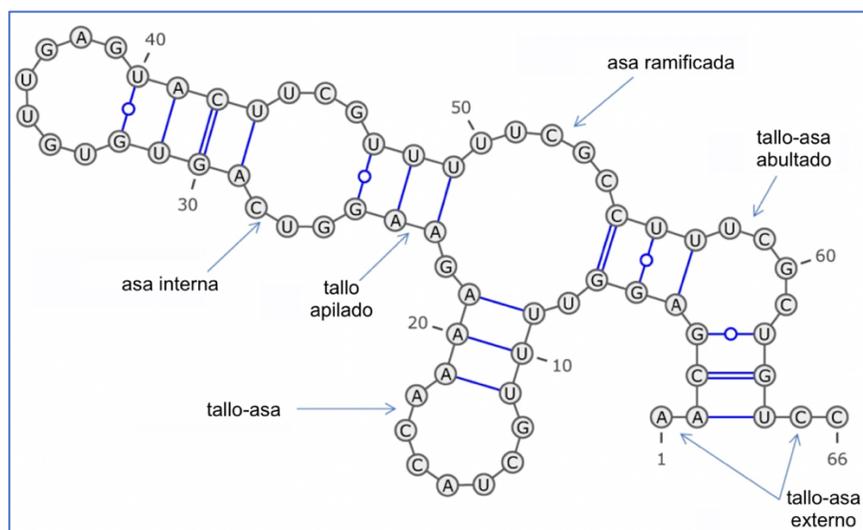


Figura 6.- Nomenclatura de estructuras secundarias de ARN [Adaptado de [Sato K. et al. 2021](#)].

Las predicciones de estructuras secundarias de ARN utilizando el programa mfold son de las más utilizadas y pueden dar mayor certeza acerca de cómo están conformadas comparado con las obtenidas a través de otros programas informáticos como ViennaRNA [[Zao Y, et al. 2018](#)].

Las predicciones de estructuras secundarias de RNT son de utilidad para comprender la funcionalidad y la regulación en cis involucrada en los ciclos replicativos de los virus. Entre las estructuras más caracterizadas están las de poliovirus [[Liu Y., et al, 2010](#)], rinovirus [[López-Ulloa, B., et al, 2022](#)] y dengue virus [[Shivaprasad S., et al, 2022](#)]. Las cuales han ayudado a revelar la regulación de mecanismos de traducción, replicación y encapsidación viral [[Liu Y., et al, 2010](#)].

Se han reportado previamente predicciones de algunas estructuras secundarias de las RNT 5' y 3' de los astrovirus clásicos y no clásicos [[De Nova-Ocampo et al, 2019](#); [Jiang H, et al. 2013](#); [Kapoor A., et al, 2009](#); [Monceyron C., et al, 1997](#)].

Teniendo en cuenta que existe poca información acerca del ciclo replicativo de los astrovirus humanos, se propuso identificar las proteínas de unión a ARN que se encuentran asociadas a las regiones no traducidas de los astrovirus clásico 8 y no clásico VA1, los cuales tienen relevancia epidemiológica y se postula que tienen distintos mecanismos celulares y moleculares.

Hipótesis

Las regiones no traducidas del ARN genómico de HAstV reclutan proteínas de unión a ARN del huésped durante su ciclo replicativo.

Objetivo general

Identificar y caracterizar al conjunto de proteínas celulares con dominios de unión a ARN que interactúan con las regiones no traducidas del ARN genómico de HAstV.

Objetivos particulares

- Establecer un sistema de marcaje intracelular para las proteínas de unión a ARN que se unen a las RNT 5' y 3' del HAstV clásico 8 y el HAstV no clásico VA1, usando el ensayo RaPID.
- Identificación de las proteínas marcadas y purificadas.
- Realizar un análisis bioinformático para caracterizar las proteínas de unión a ARN identificadas.

Materiales

1.- Células

En este trabajo se emplearon células embrionarias de riñón humano 293T (*HEK-293T*, de sus siglas en inglés). Éstas se cultivaron en medio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, a 37°C y 5% de CO₂.

2.- Vectores

Los vectores del ensayo RaPID, “RNA motif plasmid cloning backbone” con el número de acceso #107253 y “BASU RaPID plasmid” con el número de acceso #107250. Estos fueron adquiridos del repositorio de plásmidos Addgene.

3.- Anticuerpos

Para la detección de las distintas proteínas mediante ensayos de Western blot e inmunoprecipitación, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: C23 [Nucleolina] (D-6, Santa Cruz Biotechnology); GADD 34 (B-10, Santa Cruz Biotechnology). Los anticuerpos conjugados con peroxidasa α -ratón (Invitrogen) fueron utilizados como anticuerpos secundarios.

4.- Oligonucleótidos de las RNT 5' y 3' del ARN genómico de los astrovirus humanos clásico 8 Yuc-8 y no clásico VA-1.

Las regiones de interés correspondientes a las RNT de los HAstV se sintetizaron en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se utilizó la secuencia depositada en el Genbank AF260508_HAstV8_2016 para obtener las secuencias completas de las RNTs 5' y 3' de los astrovirus clásico 8 Yuc-8, nucleótidos del 1-80 y de 6674-6759 respectivamente, y la secuencia depositada en el Genbank NC_013060_HAstVVA1_2018 para obtener las secuencias de las RNTs 5' y 3' del astrovirus no clásico VA-1, nucleótidos del 1-38 y del 6489-6586 respectivamente. De acuerdo con el ensayo RaPID, era necesario añadir la secuencia de nucleótidos “GCTT” al inicio de la cadena positiva y “AGCT” al final de la cadena negativa, para generar extremos cohesivos al momento de integrarse en el sitio de corte del vector inducido por la enzima BsmBI. Las secuencias de éstos oligonucleótidos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.- Secuencia de oligonucleótidos de las RNTs del astrovirus clásico 8 Yuc-8 y no clásico VA1. Secuencia sentido (S); secuencia anti sentido (R). Resaltado en negritas se muestran los extremos cohesivos sobresalientes. La síntesis de los oligonucleótidos se llevó a cabo en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Oligonucleótido	Secuencia
HastV-8-RNT 5' (S)	GCTT CCA AAA GGG GGG TGG TGA TTG GCC TTT GGC TTA TCA GTG TAT AAA CAA GAT TTT CTA CAC TCT TTT ATT AAA TAA TTG ACA
HastV-8-RNT 5' (R)	AGCT TGT CAA TTA TTT AAT AAA AGA GTG TAG AAA ATC TTG TTT ATA CAC TGA TAA GCC AAA GGC CAA TCA CCA CCC CCC TTT TGG
HastV-8-RNT 3' (S)	GCTT GGA TCG AGG GTA CAG CTT CCT ATC CTT CTT TTC TGT CTC TGT TTA GAT TAT TTT AAT CAC CAT TTA AAA TTG ATT TAA TCA GAT GC
HastV-8-RNT 3' (R)	AGCT GCA TCT GAT TAA ATC AAT TTT AAA TGG TGA TTA AAA TAA TCT AAA CAG AGA CAG AAA AGA AGG ATA GGA AGC TGT ACC CTC GAT CC
HastV-VA1-RNT 5' (S)	GCTT CCA AAT TTG TTG GCT GTG CCG ATT GGC ACT GGT GGG TC
HastV-VA1-RNT 5' (R)	AGCT GAC CCA CCA GTG CCA ATC GGC ACA GCC AAC AAA TTT GG
HastV-VA1-RNT 3' (S)	GCTT GAT CGA GGG TAC AGC GCT AAA TTG ATT ACT AGA GGT GTT AAT CAA TAA ATC ATT GAT TTG GTG ATT GAT ATG ATC AAT TTG AAA TTG AAA TTT CCA GCA AAA AAA AAA AAA
HastV-VA1-RNT 3' (R)	AGCT TTT TTT TTT TTT TGC TGG AAA TTT CAA TTT CAA ATT GAT CAT ATC AAT CAC CAA ATC AAT GAT TTA TTG ATT AAC ACC TCT AGT AAT CAA TTT AGC GCT GTA CCC TCG ATC

5.- Oligonucleótidos para PCR de colonia

Se sintetizaron oligonucleótidos para identificar por medio de la técnica de PCR a las regiones de interés correspondientes a las RNT de los HAsV una vez que estuvieron integradas en los vectores construidos. Estos oligonucleótidos se sintetizaron en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se utilizó la secuencia depositada en el Genbank AF260508_HAsV8_2016 para obtener las secuencias completas de las RNTs 5' y 3' del astrovirus clásico 8 Yuc-8 y la secuencia depositada en el Genbank

NC_013060_HAstVVA1_2018 para obtener las secuencias completas de las RNTs 5' y 3' del astrovirus no clásico VA-1. Adicionalmente se sintetizó un oligonucleótido para identificar un fragmento denominado RaPID-eGFP perteneciente al vector RaPID original. La secuencia de estos oligonucleótidos se muestra en la tabla 2.

Tabla 2.- Oligonucleótidos usados en las reacciones de PCR de colonia. Estos se sintetizaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Oligonucleótidos	Secuencia
RaPID-eGFP (Sentido)	CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G
HastV-8-RNT 5' (Reverso)	TGT CAA TTA TTT AAT AAA AGA GTG TAG AAA ATC TTG TTT ATA CAC TGA TAA GCC AAA GGC CAA TCA CCA CCC CCC TTT TGG AAG C
HastV-8-RNT 3' (Reverso)	GCA TCT GAT TAA ATC AAT TTT AAA TGG TGA TTA AAA TAA TCT AAA CAG AGA CAG AAA AGA AGG ATA GGA AGC TGT ACC CTC GAT CCA AGC
HastV-VA1-RNT 5' (Reverso)	GAC CCA CCA GTG CCA ATC GGC ACA GCCA ACA AATT TGG AAG C
HastV-VA1-RNT 3' (Reverso)	TTT TTT TTT TTT TGC TGG AAA TTT CAA TTT CAA ATT GAT CAT ATC AAT CAC CAA ATC AAT GAT TTA TTG ATT AAC ACC TCT AGT AAT CAA TTT AGC GCT GTA CCC TCG ATC AAG C

Métodos

1.- Construcción de los 4 vectores RaPID correspondientes a las RNT de HastV clásico serotipo 8 y HastV no clásico VA1.

1.1.- Hibridación de los oligonucleótidos de las RNT 5' y 3' de astrovirus clásico 8 Yuc-8 y no clásico VA-1.

El primer paso consiste en insertar la secuencia de interés en el vector de expresión "RNA motif plasmid cloning backbone" o vector RaPID. Para la integración, se sintetizó la cadena de ADNc a integrar, compuesta de la secuencia de interés como molde para la cadena sentido, alineada a su secuencia complementaria, con el fin de obtener una doble cadena que será clonada en el vector RaPID.

Los oligonucleótidos se aparearon para formar la doble cadena de ADN, la cuál se clonó en el vector RaPID, para ello se mezclaron 100 μ M de las cadenas sentido y 100 μ M antisentido en 5 μ L de buffer de PCR 10X y 42 μ L de agua ultrapura, esta solución se calentó a 94 °C durante 2 minutos y se dejó enfriar gradualmente hasta alcanzar temperatura ambiente. Se obtuvo una concentración final de 100 μ M de oligonucleótidos apareados.

1.2.- Clonación de las RNT 5' y 3' de astrovirus clásico 8 Yuc-8 y no clásico VA-1 en los vectores RaPID.

Los oligonucleótidos alineados correspondientes a las RNT de los astrovirus se ligaron a los vectores RaPID, previamente cortados en el sitio de restricción BsmBI. Para la reacción de corte se utilizaron 1 μ g del vector RaPID, los cuales se mezclaron con 5 μ L de buffer SmartCut 10X, 1 μ L de enzima BsmBI y 43 μ L de agua de alta pureza. Esta mezcla se incubó por 1 hora a 37 °C. El fragmento de mayor tamaño del plásmido digerido se separó en un gel de agarosa al 1% (1 g de agarosa, 100 mL de buffer Tris-Acetato-EDTA 1X y 6 μ L de bromuro de etidio), posteriormente se purificó mediante el kit de purificación de ADN desde agarosa GeneJet Gel (Thermo Fisher), de acuerdo con las instrucciones de proveedor y se cuantificó por espectrofotometría UV. Para la reacción de ligación se tomaron 20 ng del fragmento de mayor tamaño del plásmido digerido puro y oligonucleótidos alineados de las diferentes RNT de interés previamente descritas. Esta reacción consistió en agregar el vector y oligonucleótidos hibridados de cada una de las regiones de interés en una proporción de 1:5, se agregó 1 μ L de enzima DNA ligasa T4 (Thermo Fisher), 2 μ L de buffer Ligasa 10X y 13 μ L de agua ultrapura. Esta reacción de ligación se incubó toda la noche a 16 °C. Se purificaron los vectores con el kit GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo) de acuerdo con las instrucciones de proveedor, se cuantificó por espectrofotometría UV y se guardaron a -20 °C.

1.3.- Transformación bacteriana de los vectores construidos.

Una vez que se purificó la ligación, se utilizaron 5 μ L para transformar bacterias DH5 α electrocompetentes. Este volumen se agregó en condiciones de esterilidad a 50 μ L de bacterias en hielo. Posteriormente se transformaron utilizando un electroporador BioRad Gene Pulser II a 1,8 kV durante 2 segundos. Estas se colocaron en 500 μ L de medio LB (Lysogeny broth) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. El volumen final se plaqueó en una caja Petri con un medio LB adicionado con carbenicilina (10 μ g / mL), durante toda la noche.

Posteriormente se realizó una PCR de colonia a las clonas bacterianas con resistencia a carbenicilina.

1.4.- PCR de colonia de los vectores construidos.

Para verificar la presencia e identidad del inserto de interés en las colonias que crecieron bajo la presión de selección, se realizó una PCR de colonia. Se prepararon 10 reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos previamente descritos en la tabla 2. Para ello se preparó una mezcla maestra: 10 µL de Buffer 10X PCR (Thermo), 1 µL de oligonucleótidos sentido, 1 µL de oligonucleótidos antisentido, 1 µL de Taq Polimerasa (Thermo), 2 µL de dNTPs, 85 µL de agua ultrapura. Posteriormente se colocan las reacciones en un termociclador con el programa mostrado en la tabla 3. Una vez concluido el PCR se corroboró la presencia del segmento de ADN corriendo un gel de agarosa al 1%.

Tabla 3.- Programa del termociclador para la PCR de colonia.

Etapa	Tiempo/Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	5 minutos a 94°C	1
Desnaturalización	30 segundos a 94°C	30
Alineamiento	30 segundos a 50°C	
Extensión	30 segundos a 72°C	
Extensión final	5 minutos a 72°C	1
Almacenamiento	∞ de tiempo a 4°C	-

1.5.- Purificación de los vectores RaPID HAstV8-5, HAstV8-3, HAstVV1-5 y HAstVV1-3.

Una vez que se corroboró la identidad del inserto de interés en las colonias analizadas, se tomó el remanente de la colonia positiva para la amplificación del vector. Este remanente se sometió a crecimiento en suspensión en medio LB adicionado con carbenicilina (10 µg / mL) a 37 °C durante toda la noche. Doce horas después, se colectó la suspensión y se centrifugó a 4000 RPM durante 10 min a 4 °C para formar un pellet que se utilizó para extraer y purificar los vectores. La purificación se realizó con el kit GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo) de acuerdo con las instrucciones de proveedor. Se cuantificó por espectrofotometría UV y se envió a secuenciar a la Unidad de Secuenciación del IBt-UNAM para verificar su identidad.

Adicionalmente se construyó un quinto vector a partir del plásmido RaPID que fue utilizado como control de biotilación inespecífica. Este control cuenta solo con las 6 regiones BoxB. Para la restricción se preparó una reacción que contenía 1 µg del vector RaPID, 5 µL de buffer SmartCut 10X, 1 µL de enzima BsmBI y 43 µL de agua de alta pureza. La reacción se incubó por 1 hora a 37 °C. El fragmento de mayor tamaño del plásmido digerido se separó en un gel de agarosa al 1%, posteriormente se purificó mediante el kit de purificación de ADN desde agarosa GeneJet Gel (Thermo Fisher), de acuerdo con las instrucciones de proveedor y se cuantificó por espectrofotometría UV.. Los extremos del vector se hicieron romos para poder ligarse con el tratamiento de la enzima Klenow, la reacción consistió en el volumen total eluido de la purificación del fragmento de mayor tamaño del plásmido digerido, 2 µL de enzima Klenow, 4 µL de Buffer Klenow, 3 µL de dNTPs (10 mM) y 6 µL de agua de alta pureza, la reacción se llevó a cabo por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de reacción, se purificó con el kit GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo) de acuerdo con las instrucciones de proveedor. Se tomaron 25 µL de la reacción previamente purificada y se religó el vector con la siguiente mezcla de reacción: se agregó 1 µL de enzima DNA ligasa T4 (Thermo Fisher), 2 µL de Buffer Ligasa 10X y 13 µL de agua ultrapura. Esta reacción de ligación se incubó toda la noche a 16 °C. Se purificaron los vectores con el kit GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo) de acuerdo con las instrucciones de proveedor, se cuantificó por espectrofotometría UV y se guardaron a -20 °C.

2.-Transfección del sistema RaPID a células HEK-293T

Se transfectaron células HEK-293T con los vectores RaPID construidos y descritos previamente. Para el ensayo de RaPID-espectrometría de masas, se inoculó una placa P100 con 3×10^6 células, una vez que alcanzó el 85% de confluencia se transfectó con 12 µg del vector RaPID y 2 µg del vector BASU, junto con 30 µL de lipofectamina 2000 (Thermo), correspondiente a una proporción lipofectamina-ADN de 2:1, utilizando como diluyente MEM sin suero, siguiendo el protocolo del proveedor. Las células transfectadas se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ por 24 horas. Para ensayos de prueba, se utilizó la proporción lipofectamina-ADN de 2:1 y se siguió el protocolo del proveedor.

2.1.- Marcaje de proteínas adicionando biotina.

Veinticuatro horas post transfección se realizó el cambio de medio de cultivo por medio de biotilación, el cual está compuesto de medio de cultivo DMEM Advance suplementado con 5% de suero fetal bovino y biotina (Sigma) a una concentración de 0.2 mM.

2.2.- Colección de pellet de células HEK-293T transfectado con el sistema RaPID.

Cuarenta y ocho horas post transfección, se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS + EDTA suavemente. La monocapa celular se despegó utilizando un scrapper. La monocapa despegada se resuspendió en 1 mL de PBS 1X y se colectó en un tubo eppendorff de 1.5 mL. El tubo se centrifugó por 5 minutos a 2000 RPM y 4 °C para formar un pellet, se retiró el sobrenadante, se resuspendió en PBS 1X y se repitió este proceso una vez más para retirar el remanente del medio de cultivo. Se tomó una alícuota de 30 µL de células para su análisis por Western blot durante la segunda resuspensión. Al pellet obtenido y la alícuota se centrifugaron una vez más por 5 minutos, 2000 RPM y 4 °C, y se retiró el sobrenadante. A la alícuota se le añadieron 30 µL de buffer Laemmli 3X (Tris-

HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% en agua ultrapura), se hirvió durante 5 minutos y se guardó a -20 °C para su posterior análisis. Los pellets se utilizaron para la purificación de las proteínas biotiniladas y la identificación por espectrometría de masas, más adelante en el texto se describe el proceso.

2.3.- Captura de las proteínas biotiniladas.

Los pellets de las células HEK-293T transfectadas con los diferentes vectores RaPID se lisaron utilizando 200 μ L de buffer de lisis (0.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0.2% SDS, 1 mM DTT) a temperatura ambiente. Las muestras se aforaron a un volumen final de 440 μ L, añadiendo 20 μ L de Triton X-100 al 25% y 220 μ L de buffer de lavado 4 (50 mM Tris-HCl). Estas muestras se sonicaron durante 10 segundos a un 10% de amplitud, manteniendo las muestras en hielo. El lisado sonificado se centrifugó a 15,000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se filtró por medio de un spin-filter de MWCO 3K (Sartorius), los cuales se centrifugaron a 1500 g durante 1 hr a 4 °C. Se recuperó el retenido a un tubo eppendorff y se estimó la concentración de proteína por medio de espectrofotometría de UV. Una vez conocida la concentración de proteína se agregaron 50 μ L de microesferas de estreptavidina (New England BioLabs) por mg de proteína. La solución de proteína y microesferas se incubaron en agitación suave durante toda la noche a 4 °C.

2.4.- Purificación de las proteínas biotiniladas.

Las microesferas magnéticas acopladas a estreptavidina se incubaron por 12 horas con las proteínas biotiniladas. Se lavaron dos veces con 1 mL de buffer de lavado 1 (2% SDS en agua ultrapura). Se realizó un tercer lavado con 1 mL de buffer de lavado 2 (0.1% Na-DOC, 1% Triton X-100, 0.5M NaCl, 50 mM HEPES pH 7.5, 1 μ M EDTA en agua ultrapura). Y un cuarto lavado con 1 mL de buffer de lavado 3 (0.5% Na-DOC, 250 μ M LiCl, 0.5% Nonidet P-40, 10 mM Tris-HCl, 1 μ M EDTA en agua ultrapura). El quinto lavado se realizó con 1 mL de buffer de lavado 4 (50 mM Tris-HCl en agua ultrapura). Terminado este último lavado se aspiró cuidadosamente todo el volumen de buffer de lavado 4 y se añadieron 30 μ L de buffer Laemmli 3X (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5% en agua ultrapura). Las mezclas se hirvieron por 5 minutos y se almacenaron a -80 °C. Todos los lavados se realizaron resuspendiendo las microesferas en vortex durante 30 segundos, posteriormente se colocaron en un soporte magnético durante 5 minutos. Se aspiró cuidadosamente el volumen y se desechó. Posteriormente se incubó en agitación suave durante 5 minutos.

2.5.- Preparación de muestras para la identificación de proteínas por espectrometría de masas.

Las muestras de proteínas biotiniladas purificadas se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (*SDS-PAGE*, por sus siglas en inglés) (1.8 mL de agua destilada, 1.33 mL acrilamida-bis 30-0.8%, 0.8 mL Tris pH 8.8, 40 μ L SDS 10%, 25 μ L persulfato de amonio, 4 μ L TEMED), en buffer de tris-glicina (20 mM Tris, 150 mM Glicina) a 120 V durante 90 minutos. Posteriormente se tiñó el gel con azul de Coomassie (0.08% de azul brillante de Coomassie G250, 10% de ácido cítrico, 8% de sulfato de amonio, 20% metanol, 0.1% de ácido acético [v/v]) durante toda la noche, evitando tocar gel. Terminado el tiempo de incubación se destiñó el gel mediante lavados con agua desionizada hasta que se

observaron las bandas de proteínas. Estas, se cortaron y se enviaron para su identificación al Laboratorio Universitario de Proteómica del IBt – UNAM, donde las proteínas fueron extraídas del gel, digeridas con tripsina y analizadas por nano cromatografía de líquidos (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 RSLC Nano System Flow) acoplada a un espectrómetro de masas de trampa de iones de baja resolución con un detector cuadrupolar segmentado (MS/MS) (Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos Tribrid).

3.- Ensayos de inmunoprecipitación

Para los ensayos de inmunoprecipitación se utilizó el procedimiento descrito previamente en nuestro laboratorio por [Hernández J., 2021](#). Para formar el complejo anticuerpo-microesferas magnéticas, se mezclaron 10 µL de microesferas magnéticas acopladas a proteína G (Thermo) y 5 µL del anticuerpo específico dirigido contra la proteína de interés, en una proporción 2:1. Se tomaron 500 µL de lisados celulares y se preaclaron con 25 µL de microesferas magnéticas acopladas a proteína G, durante una hora a 4 °C en agitación suave. Finalizado el tiempo, el lisado preaclorado se transfirió a la solución del complejo anticuerpo-microesferas magnéticas y se agitó toda la noche a 4 °C. Las microesferas magnéticas se lavaron 4 veces con buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.005%, EDTA 1 mM y NaCl 150 mM) durante 5 minutos a 4 °C. Una vez terminados los lavados, se descartó el sobrenadante y se añadieron 60 µL de buffer Laemmli. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis.

4.- Detección por Western blot de proteínas

La presencia de proteínas se determinó mediante ensayos de Western blot utilizando los lisados celulares de los diferentes experimentos. Para realizar esta técnica, las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) (1.8 mL de agua destilada, 1.33 mL acrilamida-bis 30-0.8%, 0.8 mL Tris pH 8.8, 40 µL SDS 10%, 25 µL persulfato de amonio, 4 µL TEMED). Se cargaron 15 µL de muestra por carril. Se corrió en buffer de tris-glicina (20 mM Tris, 150 mM Glicina) a 120 V durante 90 minutos. Posteriormente, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) en buffer CAPS (10 mM CAPS, Metanol 10%) utilizando una cámara húmeda a 120 mA durante 60 minutos.

4.1.- Detección de proteínas biotiniladas.

La membrana que contiene a las proteínas biotiniladas se bloqueó con una solución de albúmina al 10% en PBS 1X durante una 1 hora. Posteriormente se incubó en agitación suave toda la noche a 4 °C en una solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa en una dilución 1:4000 en PBS + Tween al 0.1%. Terminado el tiempo de incubación, se lavó con PBS + Tween al 0.1% durante 5 minutos por 3 ciclos y las membranas se revelaron por medio del kit de quimioluminiscencia Western Lightning Plus (Perkin-Elmer) de acuerdo con las instrucciones del proveedor, usando el escáner c-DiGit (Licor).

4.2.- Identificación de proteínas inmunoprecipitadas utilizando anticuerpos específicos.

La identificación de proteínas se realizó utilizando anticuerpos primarios específicos, Nucleolina (D-6) y GADD 34 (B-10). La membrana se bloqueó con una solución de leche descremada (Carnation) al 5% en PBS 1X durante una 1 hora y se incubó toda la noche en

agitación a 4 °C en una solución de anticuerpo primario 1:3000 en PBS + Tween al 0.1%. Transcurrida la incubación, la membrana se lavó con PBS + Tween al 0.1% durante 5 minutos por 3 ciclos y se incubó en anticuerpo secundario, anti-ratón acoplado a peroxidasa, en una concentración 1:3000 en PBS + Tween al 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, la membrana se lavó con PBS + Tween al 0.1% durante 5 minutos por 3 ciclos. Las membranas se revelaron por medio del kit de quimioluminiscencia Western Lightning Plus (Perkin-Elmer) de acuerdo con las instrucciones del proveedor, usando el escáner c-DiGit (Licor).

5.- Identificación de proteínas por espectrometría de masas y su análisis bioinformático

Una vez que el Laboratorio Universitario de Proteómica del IBt – UNAM nos entregó los resultados, se realizó un análisis bioinformático para identificar los péptidos. Se utilizó como referencia la base de datos de UniProtKB/Swiss-Prot 2021-06-18 para *homo sapiens* ([The UniProt Consortium. 2021](#)). Se utilizó el programa Proteome Discoverer 1.4 ([Thermo Scientific, Version 1.4](#)) para convertir las señales producidas por el detector del espectrómetro de masas y el cromatógrafo de líquidos a fragmentos de péptidos. Los péptidos identificados se analizaron utilizando los motores de búsqueda Sequest HT (Eng J., *et al.* 2008) y X! ([Muth T., et al. 2010](#)). El programa Proteome Discoverer también comparó el análisis de ambos motores de búsqueda con la base de datos de UniProt, generando una lista de probables proteínas identificadas. Esta lista se visualizó con el programa Scaffold 5 ([Proteome Software, Version 5.2.0](#)). Scaffold permitió comprobar la certeza de la probable identificación y clasificó las listas de proteínas identificadas, seleccionando las proteínas con un mayor número de abundancia en la muestra. Para eliminar los contaminantes inespecíficos, las proteínas identificadas con mayor grado de certeza (porcentaje de cobertura de secuencia identificada mayor al 90%), fueron filtradas de acuerdo con los criterios de la base de datos de Crapome ([Mellacheruvu D., et al. 2013](#)). Adicionalmente se eliminaron de la lista las proteínas que se encontraban en el control RaPID vacío. Las listas de proteínas pueden observarse en el Anexo 3. Para obtener la información completa acerca de las proteínas identificadas se realizó una concatenación con la base de datos de Human Protein Atlas versión 21.1 ([Uhlén M., et al. 2015](#)). Finalmente se realizó un segundo filtro en donde solo se seleccionaron proteínas con propiedades de unión a ARN. Este filtro se realizó de acuerdo con una Ontología de Genes (GO, de sus siglas en inglés) con el programa PhanterDB versión 17 ([Mi H., et al. 2019](#)). El programa Phanter permitió determinar qué papel juegan las proteínas identificadas en el metabolismo de la célula y si tienen un probable rol en la replicación de los astrovirus humanos. Para visualizar la distribución de las proteínas se construyeron diagramas de Venn, los cuales se realizaron utilizando el programa Venn Diagram de Web-based tool, Bioinformatics & Evolutionary Genomics (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

6.- Búsqueda de motivos de unión a RBPs en las RNT de los astrovirus humanos

Se realizó un análisis *in silico* para buscar motivos de unión a RBPs en las RNT en astrovirus, tanto en su extremo 5' como en 3'. Se utilizaron las secuencias completas de astrovirus humanos que se encontraban en el GenBank hasta el día 18 de marzo de 2021. Se encontraron 27 secuencias de astrovirus clásicos, así como 14 secuencias de nuevos

astrovirus humanos que contienen la RNT 5'. Para la RNT 3' se encontraron 30 secuencias de astrovirus clásicos y 20 secuencias de nuevos astrovirus humanos. Las secuencias utilizadas en este análisis se incluyen en el Anexo 2.

Se realizó la predicción de estructuras utilizando el programa mfold [Zuker M. 2003] con el parámetro de simulación de 37 °C para la búsqueda de motivos conservados presentes en las estructuras. También se realizaron alineamientos múltiples de secuencias, los cuales fueron realizados usando el programa T-Coffee [Madeira F, *et al.* 2019; Notredame C, *et al.* 2000].

6.1.- Detección de dominios G-quadruplex.

Se realizó la búsqueda de dominios G4 utilizando el programa QGRS mapper con los siguientes parámetros: dominios de longitud máxima de 45 nucleótidos, mini grupos de 2-6 guaninas adyacentes y con tamaños probables de loops de hasta 36 nucleótidos [Kikin, *et al.* 2018].

Resultados

1.- Presencia de motivos de unión a RBPs en las RNT de astrovirus humano clásico 8 Yuc-8 y astrovirus no clásico VA1.

Se predijeron las estructuras secundarias de las RNT 5' y 3' del astrovirus clásico 8 y no clásico VA1. Esta predicción se realizó con el programa mfold. Las estructuras se muestran en las figuras 7A y 7B para el astrovirus clásico 8 y en las figuras 8A y 8B para el astrovirus no clásico VA1. Puede observarse que ambas estructuras de las RNTs de ambos astrovirus son distintas en su arreglo estructural y el largo de la secuencia. Utilizando el programa T-Coffee se reveló que existe un 30.9% de homología a nivel de nucleótidos entre las RNT 5' de astrovirus clásico 8 y no clásico VA1. En el caso de la RNT 3' de ambos astrovirus, presenta un 47.1% de diferencia a nivel de nucleótidos.

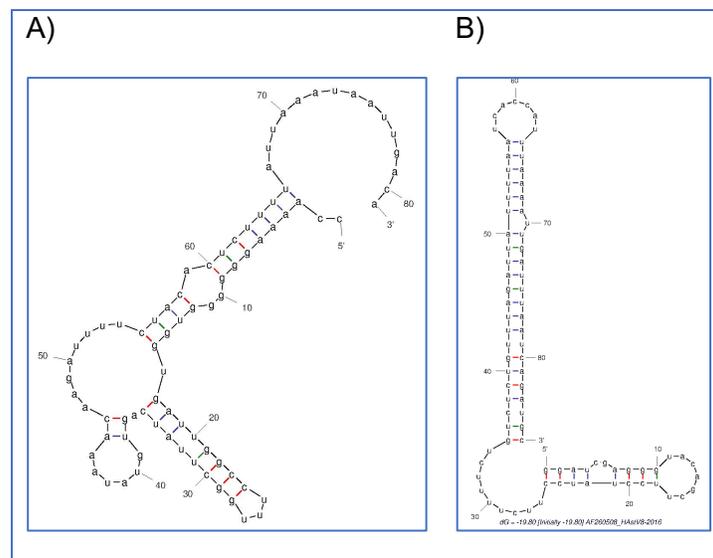


Figura 7.- Predicción de las RNT 5' y 3' del astrovirus clásico 8. En el panel A) se observa la predicción de estructura para la RNT 5', con un largo de 81 nucleótidos; y en el panel B) se observa la predicción para la RNT 3', con un largo de 86 nucleótidos. Ambas fueron realizadas con el parámetro de simulación de 37 °C.

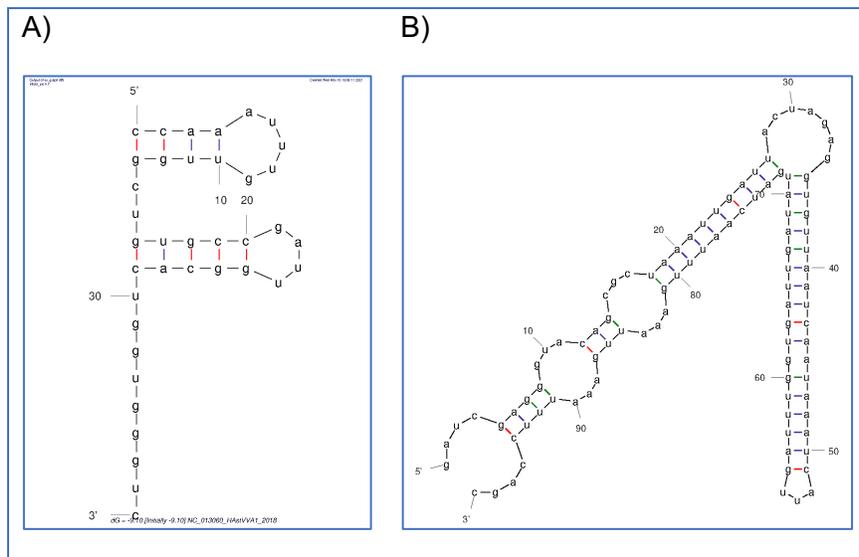


Figura 8.- Predicción de las RNT 5' y 3' del astrovirus no clásico VA1. En el panel A) se observa la predicción de estructura para la RNT 5', con un largo de 38 nucleótidos; y en el panel B) se observa la predicción para la RNT 3', con un largo de 98 nucleótidos. ambas fueron realizadas con el parámetro de simulación de 37 °C.

Para determinar los niveles de homología entre los astrovirus clásicos y no clásicos, así como la posible presencia de sitios de unión a RBP, se realizó un análisis bioinformático utilizando los programas T-Coffee y mfold, el cual reveló que a nivel de estructura secundaria existe un 80% de homología en la secuencia de nucleótidos entre las RNT 5' de los 8 serotipos de los astrovirus clásicos. En el caso de las RNT 3' encontramos un 90% de homología en la secuencia de nucleótidos. En el caso de los astrovirus no clásicos del tipo VA del 1 al 4, se reveló que a nivel de estructura secundaria existe un 26% de homología en la secuencia de nucleótidos entre las RNT 5'. En el caso de las RNT 3' encontramos un 42% de homología en la secuencia de nucleótidos para los astrovirus no clásicos del tipo VA del 1 al 5. Al comparar las RNTs de los astrovirus no clásicos del tipo VA, MLB y BF34, se reveló que existe un 30% de homología en la secuencia de nucleótidos entre las RNT 5'. En el caso de las RNT 3' encontramos 39% de homología entre los astrovirus no clásicos. Al analizar las secuencias con el programa Jalview [Waterhouse A., *et al.* 2009] se encontraron posibles sitios de interacción con RBPs, los cuales habían sido también predichos en astrovirus porcinos del tipo 3 por Ferreira y colaboradores en 2021. Los sitios de unión a ARN encontrados en las secuencias se muestran en la tabla 4.

Tabla 4.- Regiones consenso en las estructuras secundarias que posiblemente unen RBPs a las RNT de los astrovirus humanos.

Astrovirus	Sitio de unión a RBP en la RNT 5' de HastV.	RBP
Clásicos del serotipo 1 al 8, variante Pune	UUU	PTBP1/UPF1
Variante SG, VA1, VA2	UUUG	PTBP1/UPF1
Astrovirus	Sitio de unión a RBP en la RNT 3' de HAstV.	RBP
Variante VA1/HMO-C, VA5, BF34, clásicos serotipo del 1 al 8.	UACAG	SRSF5 / SRSF6
Clásicos serotipo 3,4,6,7,8	CUUUU CU	PTBP1/UPF1

2.- Secuenciación de los vectores HAstV8-5, HastV8-3, HAstVV1-5, HAstVV1-3 y RaPID vacío

Una vez que se conocían las estructuras secundarias de las RNT de los astrovirus clásico 8 y no clásico VA1, se clonaron las secuencias dentro de los vectores RaPID y se enviaron a la Unidad de Secuenciación del IBT-UNAM para verificar su identidad. Los resultados de secuenciación se analizaron con el programa Benchling, el cual permitió analizar los electroferogramas de secuenciación para buscar la posición y la secuencia de las regiones de interés. En las figuras 9, 10, 11 y 12 se muestra las posiciones de las secuencias de interés flanqueadas por las regiones BoxB. Adicionalmente en la figura 13 se muestran las regiones BoxB sin algún fragmento flanqueado correspondiente al vector RaPID vacío.

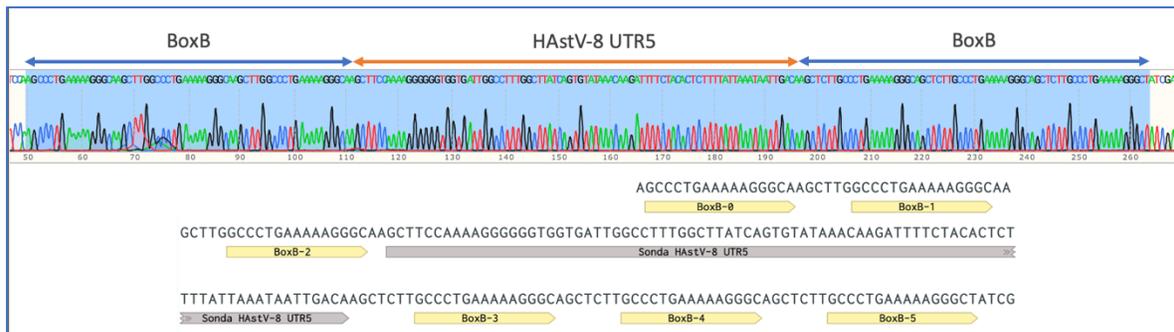


Figura 9.- Posición y secuencia de la región de interés de HastV 8 RNT 5'.

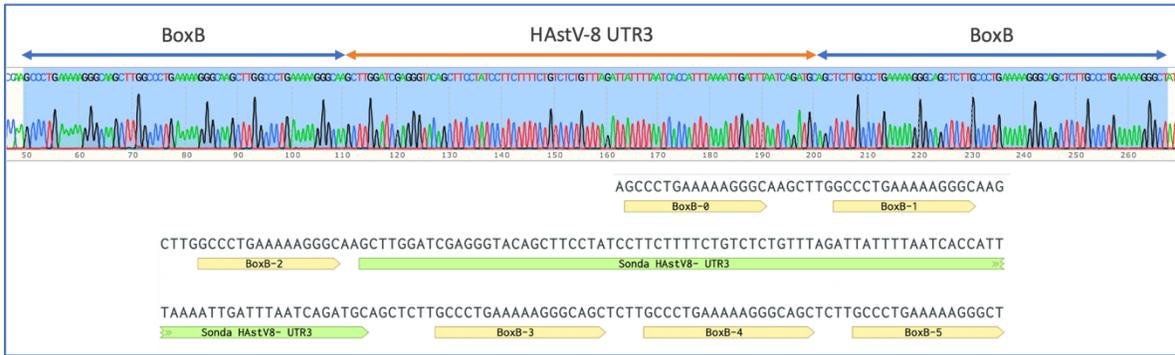


Figura 10.- Posición y secuencia de la región de interés de HastV 8 RNT 3'.

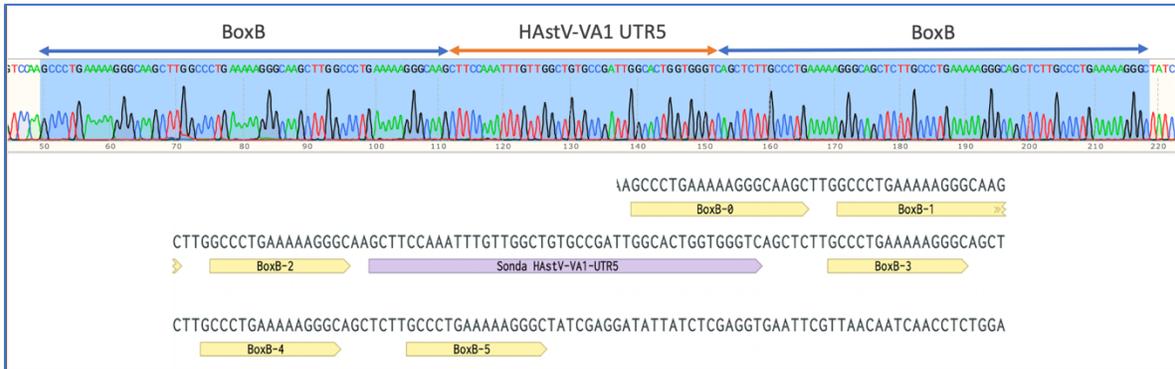


Figura 11.- Posición y secuencia de la región de interés de HastV VA1 RNT 5'.

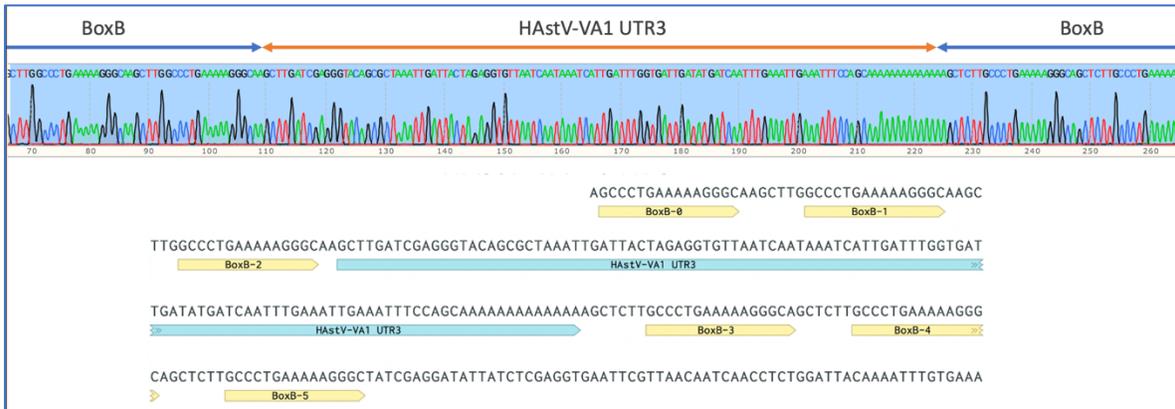


Figura 12.- Posición y secuencia de la región de interés de HastV VA1 RNT 3'.

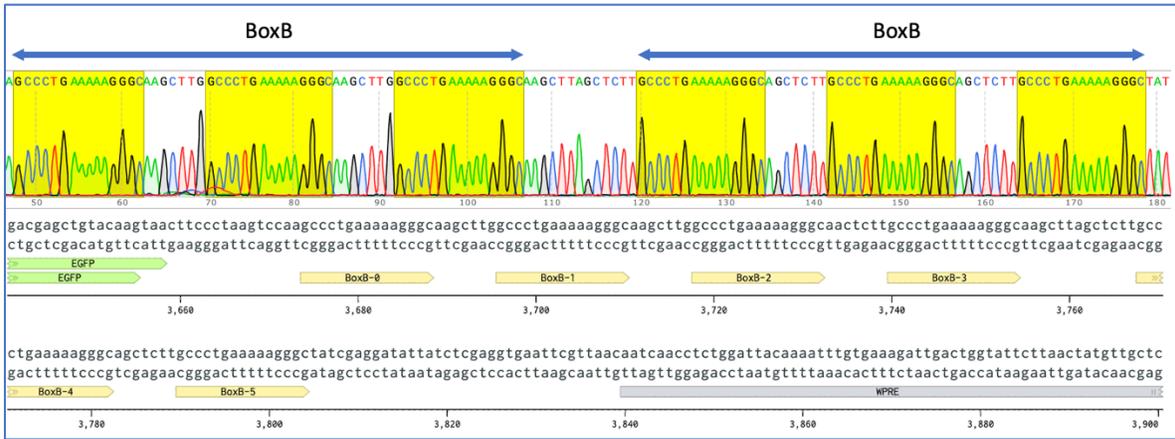


Figura 13.- Posición y secuencia de las regiones de las BoxB de RaPID vacío. En color amarillo se muestran las regiones BoxB.

3.- Estandarización de las condiciones de transfección del sistema RaPID en las células HEK- 293T.

Una vez que se confirmó la identidad de los vectores RaPID, se co-transfectaron con el vector BASU en células HEK-293T para determinar la biotiniación de las proteínas celulares cuando se transfectan diferentes cantidades del vector BASU: 0, 0.075, 0.15 y 0.30 µg, mientras que la cantidad del vector RaPID Addgene permaneció constante en 1 µg. Las proteínas biotiniladas se detectaron por la técnica de Western blot que se muestra en la figura 14. En la figura mencionada se muestran los lisados celulares de este experimento. En el carril 1, se muestra un control de células sin transfectar, donde puede observarse un patrón de bandas que corresponde a las proteínas biotiniladas de manera basal en la línea celular HEK-293T. El carril 2 muestra un control de células sin transfectar en presencia de medio de marcaje, el cual está suplementado con biotina y proporciona la disponibilidad de esta molécula para ser usada en caso de transfectar la biotin ligasa y pueda marcar a las proteínas de interés. Puede observarse un patrón de bandas similar al de células sin transfectar, lo que indica que suplementar el medio con biotina no marca a las proteínas si no hay presencia de la biotin ligasa. Este mismo patrón de bandas puede observarse cuando se transfecta 1 µg del vector RaPID Addgene y no se transfecta el vector BASU, como ocurre en los carriles 4, 6 y 8. Cuando se transfecta el vector BASU en cantidades crecientes (0.075, 0.15 y 0.30 µg) y 1 µg constante de vector RaPID Addgene puede observarse como incrementa la intensidad de las bandas con un patrón similar respecto a las proteínas de las condiciones en las que no se transfectó el vector BASU (carriles 3, 5 y 7). Adicionalmente puede observarse una disminución en la intensidad de bandas de los carriles 3, 5 y 7, conforme disminuye la cantidad del vector BASU. Decidimos transfectar 0.30 µg del vector BASU, considerando que en trabajos previos esta cantidad es funcional en distintos tipos de líneas celulares, incluido HEK-293 [Ramanathan M., *et al*, 2018; Shivaprasad S., *et al*, 2022; Verma R., *et al*, 2021]. Aunque como podemos observar en los carriles 5 y 7, el incremento en la intensidad de bandas podría indicar que la BirA* por si sola es una enzima promiscua, por ende, entre mayor concentración del vector BASU, no se descarta una mayor probabilidad de biotinilar proteínas de manera inespecífica, las cuales pueden ser descartadas durante la purificación de las proteínas biotiniladas y el

manejo de datos provenientes de espectrometría de masas, usando el control RaPID vacío, descrito más adelante en el texto.

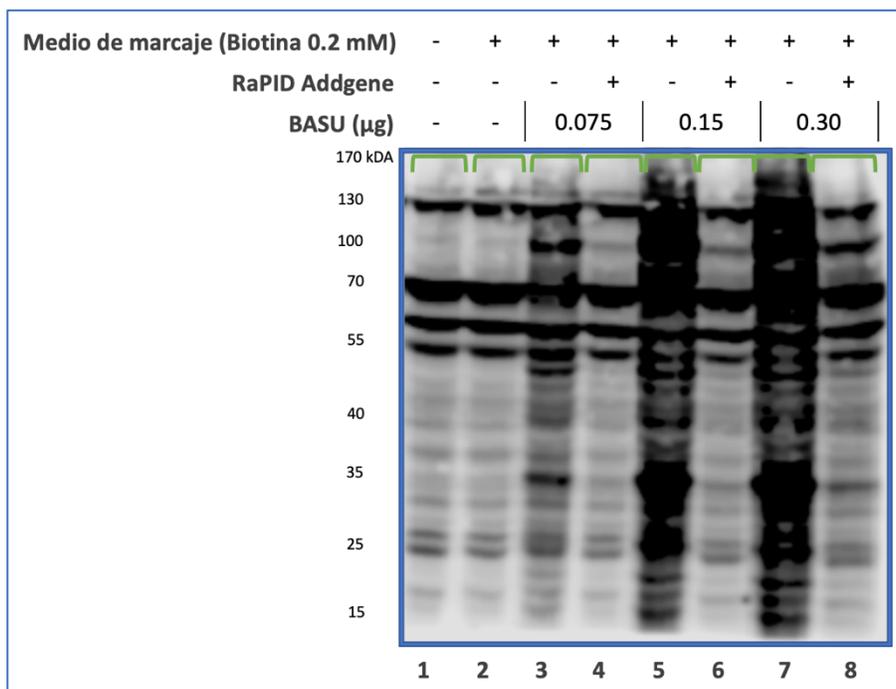


Figura 14.- Presencia de proteínas biotiniladas a distintas concentraciones del vector BASU. Western blot de lisados celulares de HEK-293T transfectadas y no transfectadas con los vectores RaPID Addgene (1µg) y BASU en distintas concentraciones (0.075, 0.15 y 0.30 µg). Se cargo un 17% del lisado celular total de una placa de 48 pozos por cada carril. La presencia de proteínas biotiniladas se reveló con el marcador estreptavidina peroxidasa en concentración 1:4000.

4.- Observación de proteínas biotiniladas en presencia de los vectores HAstV8-5', HAstV8-3', HAstVA1-5' y HAstVA1-3'.

Para determinar un posible patrón diferencial de biotinylación para cada una de las regiones de interés, se transfectaron 1 µg de cada vector RaPID HAstV y 0.3 µg del vector BASU en células HEK-293T. Se observó un cambio de la presencia de proteínas biotiniladas cuando ambos vectores son transfectados en presencia y ausencia del vector BASU.

Las proteínas biotiniladas se detectaron por la técnica de Western blot que se muestra en la figura 15. El carril 1, muestra un control de células sin transfectar, donde puede observarse un patrón de bandas que corresponde a las proteínas biotiniladas de manera basal en la línea celular HEK-293T. El carril 2 muestra un control de células sin transfectar en presencia de medio de marcaje, donde puede observarse un patrón de bandas similar al de células sin transfectar. Este mismo patrón de bandas puede observarse cuando no se transfecta el vector BASU en los carriles 8, 9, 10, 11 y 12, pero se transfecta 1 µg de cada una de las regiones de interés. En cambio, cuando se transfecta solamente el vector BASU, el caso del carril 7 puede observarse un patrón de bandas poco definido por la saturación de señal, debido a la presencia de gran cantidad de proteínas biotiniladas inespecíficamente. Cuando se transfectan ambos vectores, pueden observarse patrones de bandas de proteínas biotiniladas, esto puede observarse en los carriles 3, 4, 5, y 6, por

lo que se determinó que es funcional el ensayo con los vectores construidos. Puede observarse un patrón similar entre las 4 construcciones, debido a que son lisados celulares totales de las células transfectadas, donde la mezcla de proteínas que interactúan con las sondas transcritas por los vectores, las proteínas inespecíficas biotiniladas y las proteínas basales de la línea celular aún no estaban purificadas.

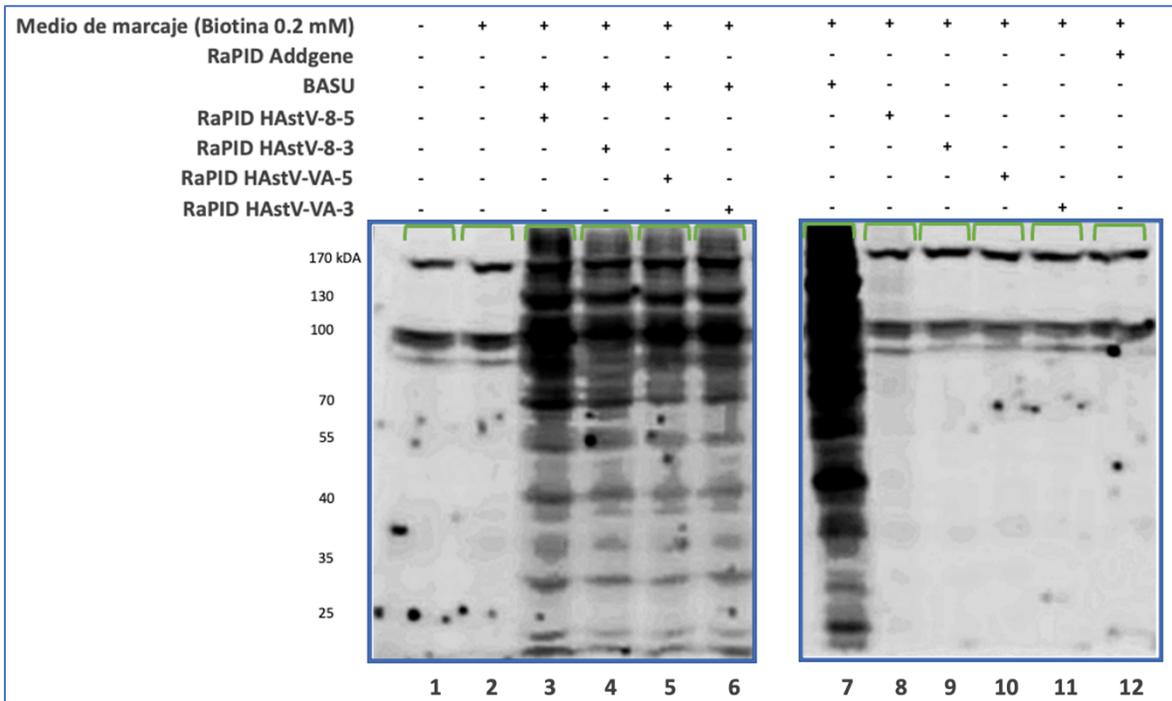


Figura 15.- Presencia de proteínas biotiniladas para cada una de las construcciones en presencia y en ausencia del segundo vector, BASU. Western blot de lisados celulares de HEK-293T transfectadas y no transfectadas con los vectores RaPID y BASU. Se cargo un 17% del lisado celular total de una placa de 48 pozos por cada carril. Este experimento se realizó en presencia de 200 μ M de biotina (excepto en carril 1) y la presencia de proteínas biotiniladas se reveló con el marcador estreptavidina peroxidasa en concentración 1:4000.

5.- Ensayo RaPID-MS en células HEK-293T

Una vez que fueron evaluadas las cantidades a transfectar de los vectores RaPID construidos y su correcta funcionalidad, se realizó el primer escalamiento de la transfección en placas P-100. El primer lote tuvo como objetivo evaluar la transfección y el proceso de captura y purificación de las proteínas biotiniladas.

En la figura 16 se muestra el control en proceso de la purificación de las proteínas biotiniladas y se pueden observar las fracciones de proteínas en los distintos pasos de la purificación. En la figura 16, también se muestra en la parte inferior el porcentaje del volumen de trabajo que fue cargado al gel de acrilamida por cada paso. El carril 1, corresponde al lisado celular obtenido a partir de células transfectadas con el vector RaPID vacío y el vector BASU, este carril se determinó como control. En los carriles 2 al 8 pueden observarse la presencia de proteínas biotiniladas contenidas en las operaciones de lisis, clarificación y separación de las proteínas de interés. Los carriles 9 y 10 corresponden a evaluación de las microesferas acopladas a estreptavidina, las cuales se usaron como

control de unión inespecífica de proteínas a las microesferas, se verificó tanto en la solución donde se conservan las microesferas, como posteriormente al lavado con buffer 4 para el uso de estas en el ensayo. El carril 11 muestra las proteínas biotiniladas contenidas en el sobrenadante obtenido después de la interacción de las microesferas acopladas a estreptavidina con la muestra durante toda la noche a 4 °C, donde puede observarse la presencia de proteínas biotiniladas no capturadas por las microesferas. Los carriles del 12 al 16 corresponden a los lavados de las microesferas, en donde se observa que no hay presencia de proteínas biotiniladas, lo cual es un indicativo que éstas no se despegan de las microesferas, ni se pierden en las operaciones de lavado. El carril 17 muestra el paso final de la purificación, que corresponde a las microesferas que fueron resuspendidas en buffer Laemmli para despegar las proteínas biotiniladas de las microesferas. La evaluación de la purificación demostró que pueden utilizarse estas condiciones para la captura de proteínas biotiniladas durante el ensayo con el vector RaPID vacío, por lo que se decidió no realizar modificaciones en el proceso para el ensayo RaPID-MS con las construcciones de interés.

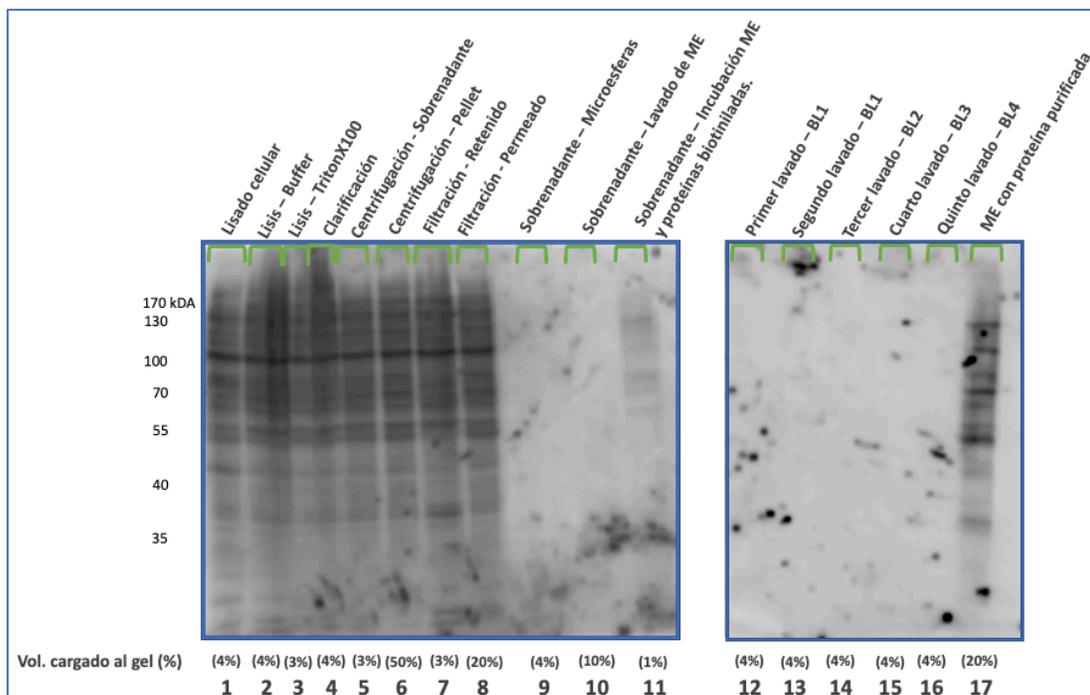


Figura 16.- Control en proceso del paso 1 al 17 de purificación de las proteínas capturadas en el ensayo RaPID-MS. Western blot del proceso de purificación de las proteínas biotiniladas provenientes del ensayo RaPID vacío en células HEK-293T. La purificación se realizó a 4 °C y la presencia de proteínas biotiniladas se reveló con el marcador estreptavidina peroxidasa 1:4000. ME: Microesferas. BL1: Buffer de lavado 1. BL2: Buffer de lavado 2. BL3: Buffer de lavado 3. BL4: Buffer de lavado 4.

5.1.- Nucleolina es marcada con biotina durante el ensayo RaPID.

Para determinar la especificidad del ensayo para marcar proteínas con capacidad de unión a ARN, se decidió detectar el marcaje de biotina en una proteína con dominios de unión a ARN reportados, como la proteína nucleolina, y otra sin dominios de unión a ARN reportado, como GADD34. El ensayo consistió en inmunoprecipitar las proteínas de interés y

determinar por Western blot la presencia del marcaje por biotina, utilizando el marcador estreptavidina peroxidasa y la presencia de la proteína por medio de anticuerpos específicos. Este ensayo nos indicaría la presencia de biotina en las proteínas analizadas.

Para el ensayo con nucleolina se utilizaron 500 μ L del sobrenadante de la purificación de las proteínas del ensayo RaPID; y se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti – nucleolina. Para el ensayo con GADD34, se utilizaron 500 μ L del sobrenadante de la purificación de las proteínas del ensayo RaPID; y se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti – GADD34. Una vez recuperada la proteína inmunoprecipitada, se analizó esta muestra en un inmuno Western blot y un Western blot contra proteínas biotiniladas.

El resultado de las inmunoprecipitaciones para cada construcción se muestra en los Western blot de las figuras 17 y 18. Se utiliza como control el lisado celular total correspondiente a cada construcción. En ambos Western blot se observa que nucleolina y GADD34 migran, tal como lo indica el proveedor, alrededor de los 110 kDa. En los inmuno Western blot se pueden observar dos bandas adicionales, correspondientes a las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, en 55 y 25 kDa respectivamente. Las cadenas de las inmunoglobulinas no se encuentran biotiniladas, como puede observarse en los Western blot anti-biotina.

En la figura 17 y 18 se muestran los resultados de Western blot de la inmunoprecipitación de las construcciones RaPID-HAstV-8 y RaPID-HAstV-VA1, respectivamente. Puede observarse que en los lisados celulares se encuentra inmunoprecipitada la proteína nucleolina a los 110 kDa y que ésta se encuentra biotinilada en el ensayo anti-biotina, ya que se observa la presencia de una banda a los 110 kDa. Lo que indica la interacción de nucleolina con las sondas RaPID. Adicionalmente se observa que en los lisados se encuentra inmunoprecipitada la proteína GADD34 a los 110 kDa y esta no se encuentra biotinilada en los ensayos de anti-biotina, ya que no se observa la presencia de una banda a los 110 kDa. Lo cual muestra que no hay interacción de GADD34 con las sondas RaPID.

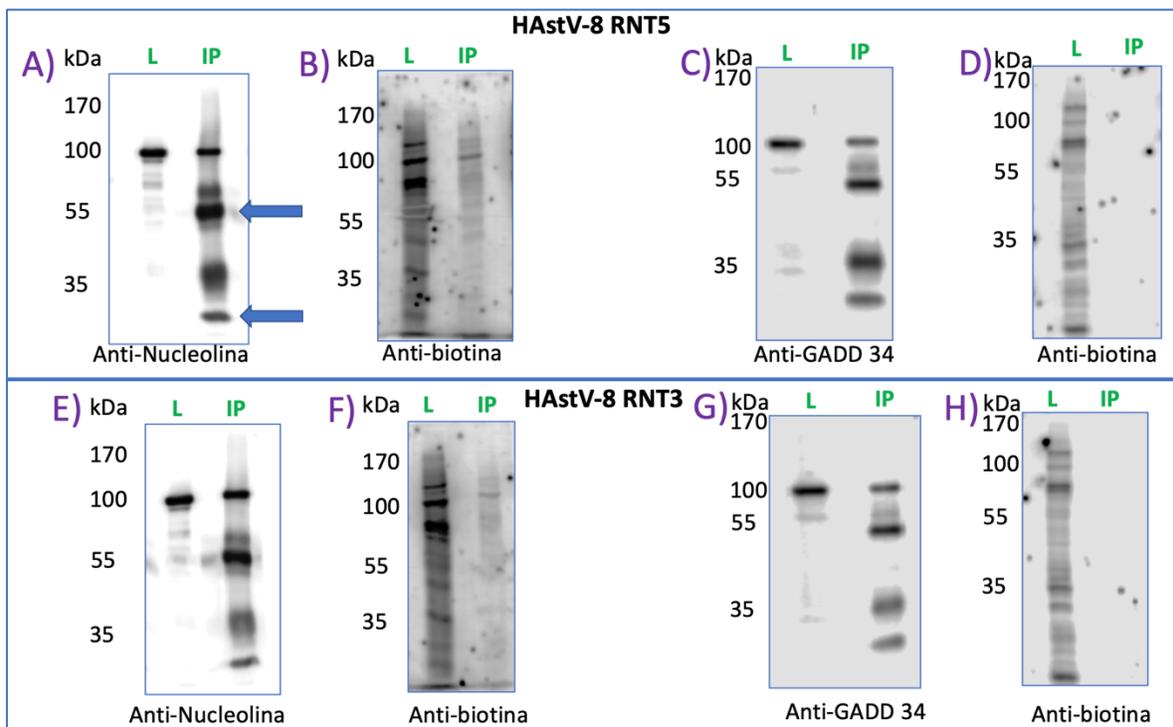


Figura 17.- Ensayo de inmunoprecipitación contra nucleolina y GADD34 en el vector correspondiente al astrovirus clásico 8. Se transfectaron células HEK-293T con los vectores RaPID con las RNT del HAstV clásico 8 y BASU. Se purificaron las proteínas biotiniladas y se realizaron inmunoprecipitaciones contra una proteína de unión a ARN, nucleolina, la cual se observa biotinilada en los paneles B y F. Como control negativo se utilizó una proteína que no tiene dominios de unión a ARN, GADD34, la cual se observa en los paneles D y H. En el panel A se señala con flechas la migración las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, en 55 y 25 kDa respectivamente. L=Lisado, IP= Inmunoprecipitación.

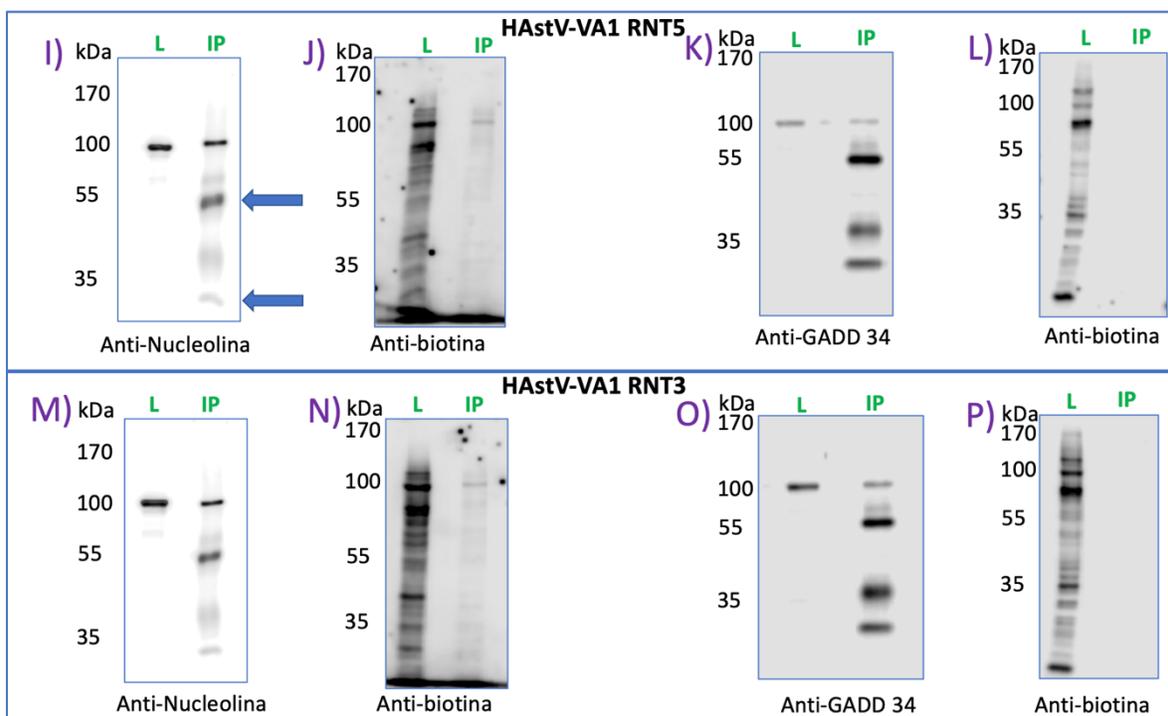


Figura 18.- Ensayo de inmunoprecipitación contra nucleolina y GADD34 en el vector correspondiente al astrovirus no clásico VA1. Se transfectaron células HEK-293T con los vectores RaPID con las RNT del HAstV no clásico VA1 y BASU. Se purificaron las proteínas biotiniladas y se realizaron inmunoprecipitaciones contra una proteína de unión a ARN, nucleolina, la cual se observa biotinilada en los paneles J y N. Como control negativo se utilizó una proteína que no tiene dominios de unión a ARN, GADD34, la cual se observa en los paneles L y P. En el panel I se señala con flechas la migración las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, en 55 y 25 kDa respectivamente. L=Lisado, IP= Inmunoprecipitación.

5.2.- Nucleolina es marcada con biotina en la sonda control sin ARN de interés.

Al detectar la presencia de biotina en nucleolina utilizando nuestro experimento anteriormente descrito, pero con el vector control RaPID vacío, se observó una banda de 110 kDa, lo cual indicaba que la proteína nucleolina se encontraba biotinilada, esto puede observarse en la figura 19.

Al realizar un análisis *in silico* utilizando el programa QGRS mapper [Kikin O., *et al.* 2006] para detectar la presencia de posibles regiones de interacción entre nucleolina y el vector RaPID vacío, se predice la existencia de 29 posibles dominios G-quadruplex dentro de la sonda de RaPID vacío, los cuales son sitios de interacción con nucleolina. Lo que sugiere la asociación de nucleolina a todas las sondas RaPID.

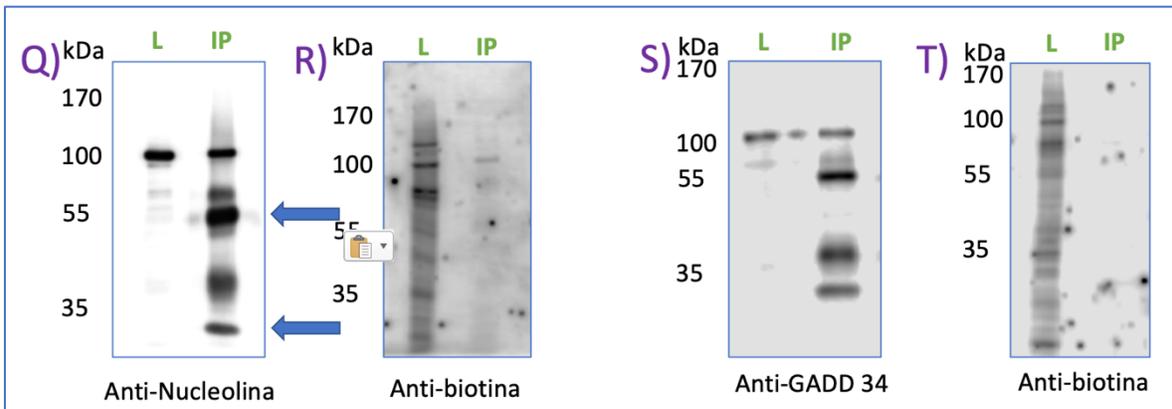


Figura 19.- Ensayo de inmunoprecipitación contra nucleolina y GADD34 en el vector correspondiente a RaPID vacío. Se transfectaron células HEK-293T con el vector RaPID vacío y BASU. Se purificaron las proteínas biotiniladas y se realizaron inmunoprecipitaciones contra una proteína de unión a ARN, nucleolina, la cual se observa biotinilada en el panel R. Como control negativo se utilizó una proteína que no tienen dominios de unión a ARN, GADD34, la cual se observa sin señal detectable de biotinilación en el panel T. En el panel Q se señala con flechas la migración las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, en 55 y 25 kDa respectivamente. L=Lisado, IP= Inmunoprecipitación.

6.- Las sondas HAstV8-5', HAstV8-3', HAstVA1-5' y HAstVA1-3' interactúan de manera específica con proteínas celulares.

Una vez que se conocía que las sondas RaPID tenían la capacidad de marcar de manera específica proteínas de unión a ARN, se realizó una réplica del ensayo de RaPID para identificar proteínas por espectrometría de masas (RaPID-MS) en el Laboratorio Universitario de Proteómica. Los resultados obtenidos se limpiaron y procesaron mediante diversos programas.

La limpieza de datos consistió en descartar a las proteínas que se hallaban interactuando con el vector RaPID vacío para eliminar de las probables interacciones inespecíficas. Adicionalmente se utilizó la base de datos de CRAPOME, la cual ayudó a descartar proteínas contaminantes de fondo que no se encontraban presentes en nuestro vector RaPID vacío, pero sí en las proteínas identificadas de nuestras otras construcciones. La base de datos de CRAPOME descarta proteínas de fondo que fueron reportadas previamente en experimentos de proteómica por espectrometría de masas, descartando interacciones inespecíficas. Entre las proteínas descritas en esta base de datos se encuentran las queratinas, tubulinas, actinas, factores de elongación, histonas y algunas proteínas ribosomales, algunas de estas últimas son descartadas por su alta abundancia en la muestra [Mellacheruvu D., *et al.* 2013]. Cabe la posibilidad de que entre las proteínas descartadas de las listas proteínas durante la limpieza tengan alguna función en el ciclo replicativo viral, ya que algunas proteínas, como las de choque térmico, siendo una limitante del control negativo de RaPID vacío y la limpieza de la base de datos CRAPOME. Una de las proteínas descartadas fue nucleolina. Ya que se demostró previamente que interacciona con todas las sondas RaPID, incluyendo el control, corroborado con nuestras primeras observaciones de especificidad del sistema.

Al terminar la limpieza de los datos, no se encontraron proteínas sin dominios de unión a ARN, como GADD34, pero sí proteínas que interactúan con ellas, como eIF3G.

6.1.- Las RNT 5' y 3' de los astrovirus clásicos interactúan con 98 proteínas.

La figura 20 muestra la distribución de las proteínas que se encontraron interaccionando con las sondas HAstV8-5' y HAstV8-3', correspondientes al astrovirus clásico 8. Se identificaron para la región RNT 5' 32 proteínas, incluida DDX23. En el caso de la RNT 3' se identificaron 52 proteínas. Ambas regiones no traducidas comparten 14 proteínas, entre las que figuran PTBP1, PCBP y DDX5. Se determinó que 13.46% de las proteínas identificadas que se encuentran interactuando con la RNT 5' se asocian con otros ARN virales; en el caso de la RNT 3', esta cifra es del 11.94%.

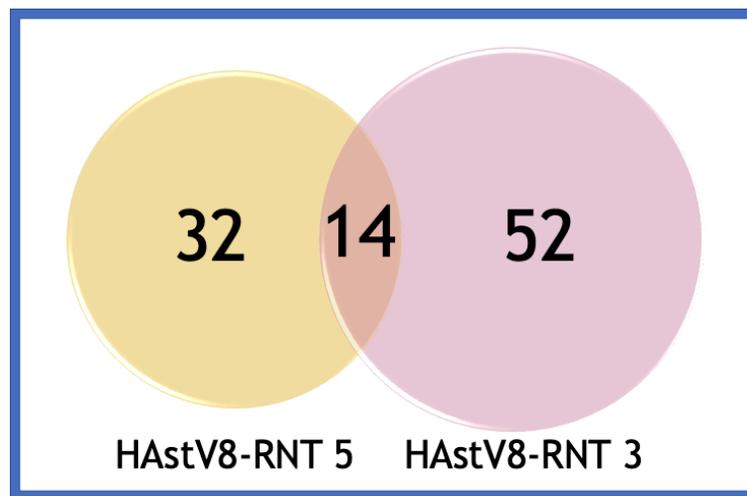


Figura 20.- Proteínas que interaccionan con las RNT 5' y 3' del astrovirus clásico 8. Se muestra un diagrama de Venn con el número de proteínas que interaccionan con respecto a las RNT 5' y 3'.

Una vez identificadas y clasificadas las proteínas, de acuerdo con la sonda con la que interactúan, se realizó su caracterización. Se muestra en las figuras 21 y 22 gráficos de pastel con las rutas celulares a las cuales pertenecen las proteínas identificadas.

Para el astrovirus clásico 8, la función molecular de las proteínas aisladas mayoritariamente proteínas de unión (69%); en menor cantidad de actividad catalítica (18%) y dependientes de ATP (13%). La RNT 3' también interacciona con proteínas de regulación traduccional (3%). En cuanto a la clasificación de los procesos biológicos a los que pertenecen estas proteínas, corresponden mayoritariamente a procesos metabólicos (39%) y celulares (39%); en menor proporción a regulación biológica (14%), procesos del desarrollo (3%), multicelulares (2%) y de localización intracelular (3%). La RNT 3' también interacciona con proteínas de respuesta a estímulos (1%) y de señalización (1%).

Con respecto a la estructura, la mayoría de las proteínas son entidades monoméricas (70%) y en menor proporción pertenecen a un complejo proteico (30%). En la clasificación de acuerdo con la clase de proteínas, mayoritariamente son proteínas pertenecientes al metabolismo del ARN (88%); en menor cantidad están involucradas en procesos traduccionales (6%). Para la RNT 5' hay de clase regulatoria (3%) y asociada a la cromatina

(3%). La RNT 3' tiene proteínas de clase adaptadora (2%), modificadora de enzimas (2%) y chaperona (2%).

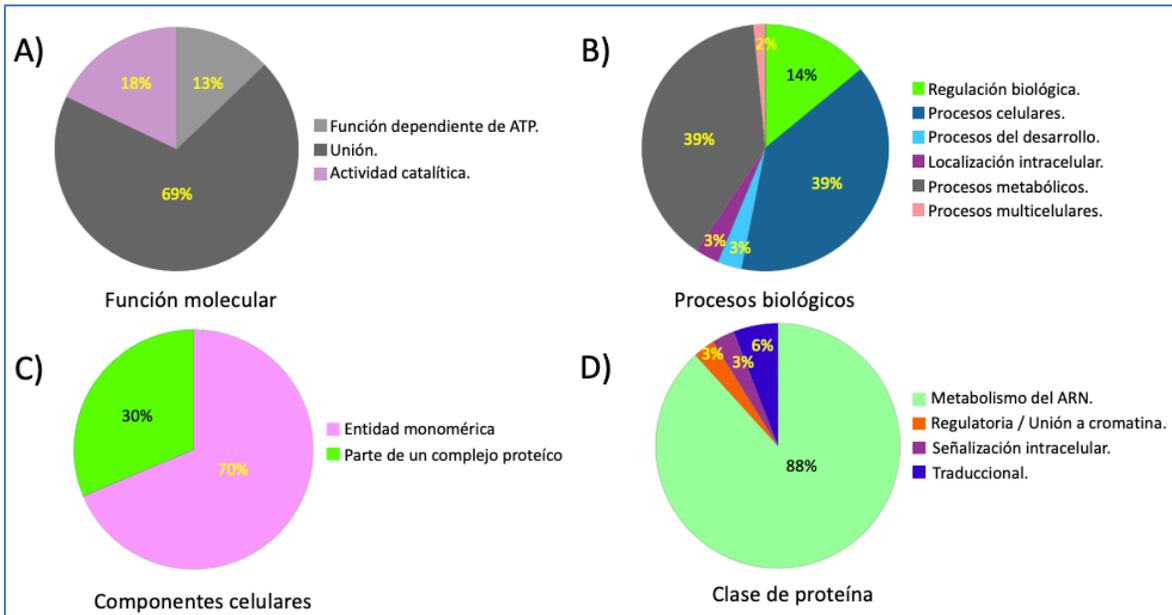


Figura 21.- Clasificación de las proteínas que interactúan con la RNT 5' de astrovirus clásico 8. Los gráficos de pastel muestran en el panel A) la clasificación con base en la función molecular de las proteínas. En el panel B) se muestra la clasificación con base en los procesos biológicos en los que están involucradas estas proteínas. En el panel C) se muestra la clasificación con base en su composición como componentes celulares, monoméricos o parte de complejos y finalmente en el panel D) se muestra la clasificación con base en su clase.

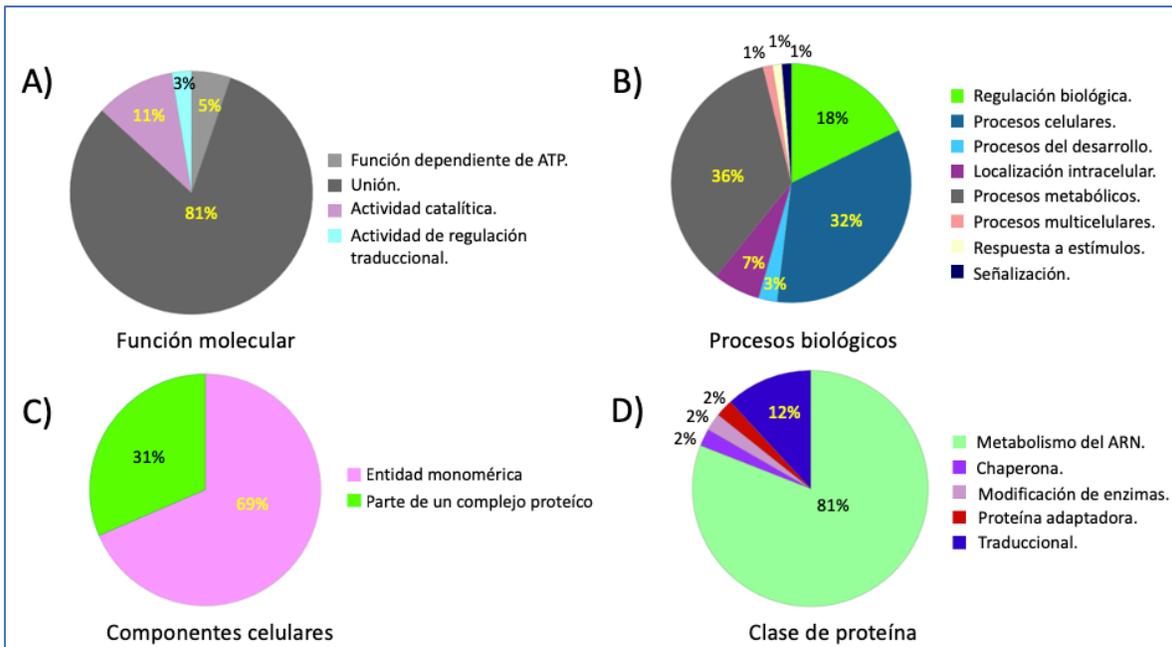


Figura 22.- Clasificación de las proteínas que interactúan con la RNT 3' de astrovirus clásico 8. Los gráficos de pastel muestran en el panel A) la clasificación con base en la función molecular

de las proteínas. En el panel B) se muestra la clasificación con base en los procesos biológicos en los que están involucradas estas proteínas. En el panel C) se muestra la clasificación con base en su composición como componentes celulares, monoméricos o parte de complejos y finalmente en el panel D) se muestra la clasificación con base en su clase.

6.2.- Las RNT 5' y 3' de los astrovirus no clásicos interactúan con 96 proteínas.

La figura 23 muestra la distribución de las proteínas que se encontraron interactuando con las sondas HAsVA1-5 y HAsVA1-3, correspondientes al astrovirus no clásico VA1. Se identificaron para la región RNT 5', 50 proteínas y para la RNT 3' se identificaron 52. Ambas RNT comparten 12 proteínas, entre las que figura PCBP. Se determinó que 18.75% de las proteínas identificadas que se encuentran interactuando con la RNT 5' se asocian con otros ARN virales; en el caso de la RNT 3', esta cifra es del 14.28%.

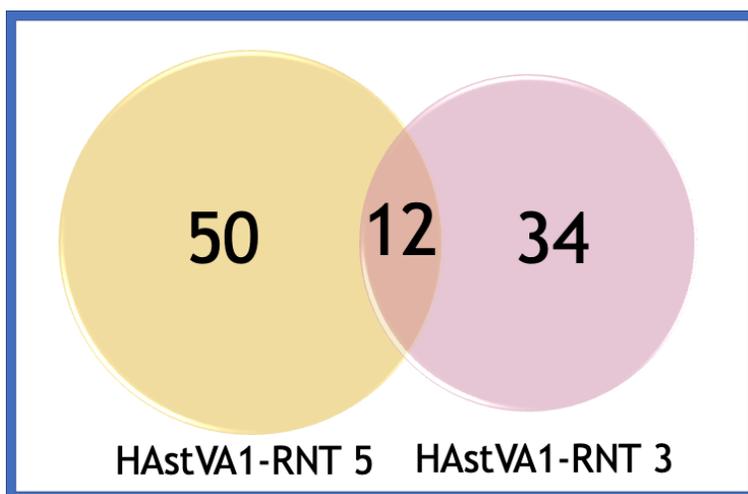


Figura 23.- Proteínas que interactúan con las RNT de astrovirus no clásico VA1. Se muestra en un diagrama de Venn el número de proteínas que interactúan con respecto a las RNT 5' y 3'.

Una vez identificadas y clasificadas las proteínas, de acuerdo con la sonda con la que interactúan, se realizó su caracterización. Se muestra en las figuras 24 y 25 gráficos de pastel con las rutas celulares a las cuales pertenecen las proteínas identificadas.

Para el astrovirus no clásico VA1, la función molecular de las proteínas que interactúan es mayoritariamente unión (70 y 92%, respectivamente); en menor cantidad tienen actividad catalítica (13 y 4%, respectivamente) y dependientes de ATP (4%). La RNT 5' también interactúa con proteínas de regulación molecular (2%), reguladores traduccionales (9%) y estructurales (2%). La clasificación de los procesos biológicos a los que pertenecen estas proteínas muestra que mayoritariamente son metabólicos (~38%) y celulares (~41%); en menor proporción a regulación biológica (17 y 12%, respectivamente), procesos del desarrollo (1%), localización intracelular (4%) y respuesta a estímulos (1%). La RNT 3' también interactúa con proteínas de señalización (1%) y procesos multicelulares (1%).

Con respecto a la clasificación de componentes moleculares, mayoritariamente son entidades monoméricas (64%) y en menor proporción pertenecen a un complejo proteico (36%), similar a lo encontrado en los astrovirus clásicos. En la clasificación de acuerdo con la clase de proteínas, mayoritariamente son proteínas pertenecientes al metabolismo del

ARN, 72% en la RNT 5' y 87% en la RNT 3'; en menor cantidad están involucradas en el metabolismo del ADN (2%), chaperonas (2%), modificación de enzimas (2%), proteínas adaptadoras (2%), traduccionales (17%) y de transporte (2%). La RNT 3' tiene porcentajes menores de proteínas chaperonas (3%), matriz extracelular (3%) y traduccionales (7%).

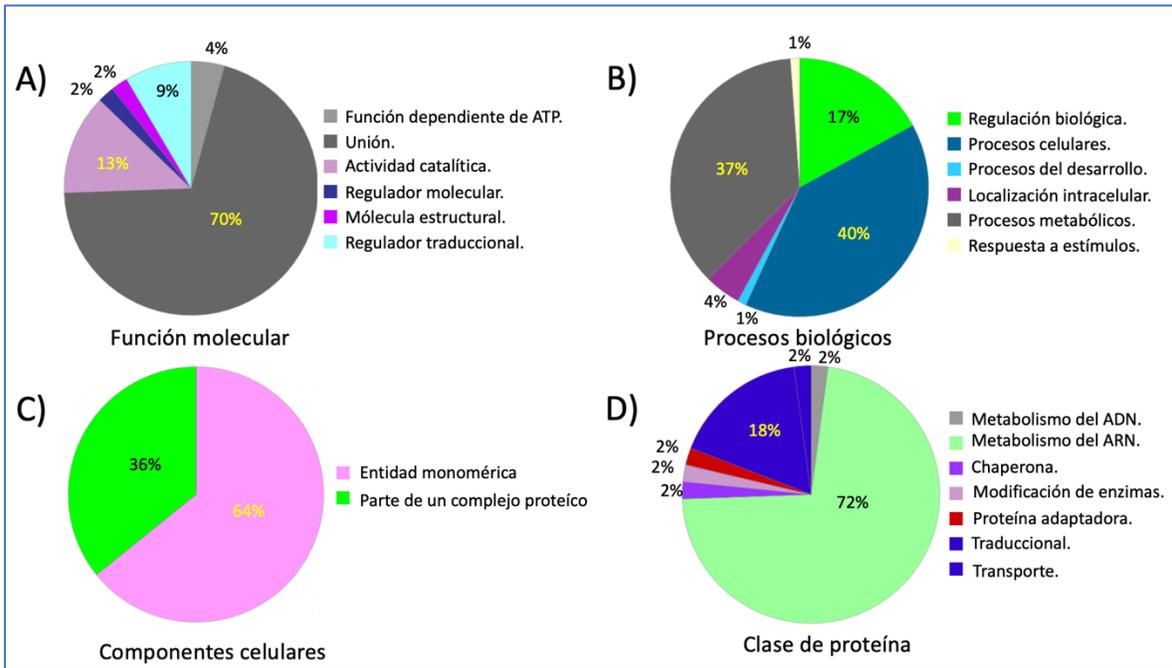


Figura 24.- Clasificación de las proteínas que interactúan con la RNT 5' de astrovirus no clásico VA1. Los gráficos de pastel muestran en el panel A) la clasificación con base en la función molecular de las proteínas. En el panel B) se muestra la clasificación con base en los procesos biológicos en los que están involucradas estas proteínas. En el panel C) se muestra la clasificación con base en su composición como componentes celulares, monoméricos o parte de complejos y finalmente en el panel D) se muestra la clasificación con base en su clase.

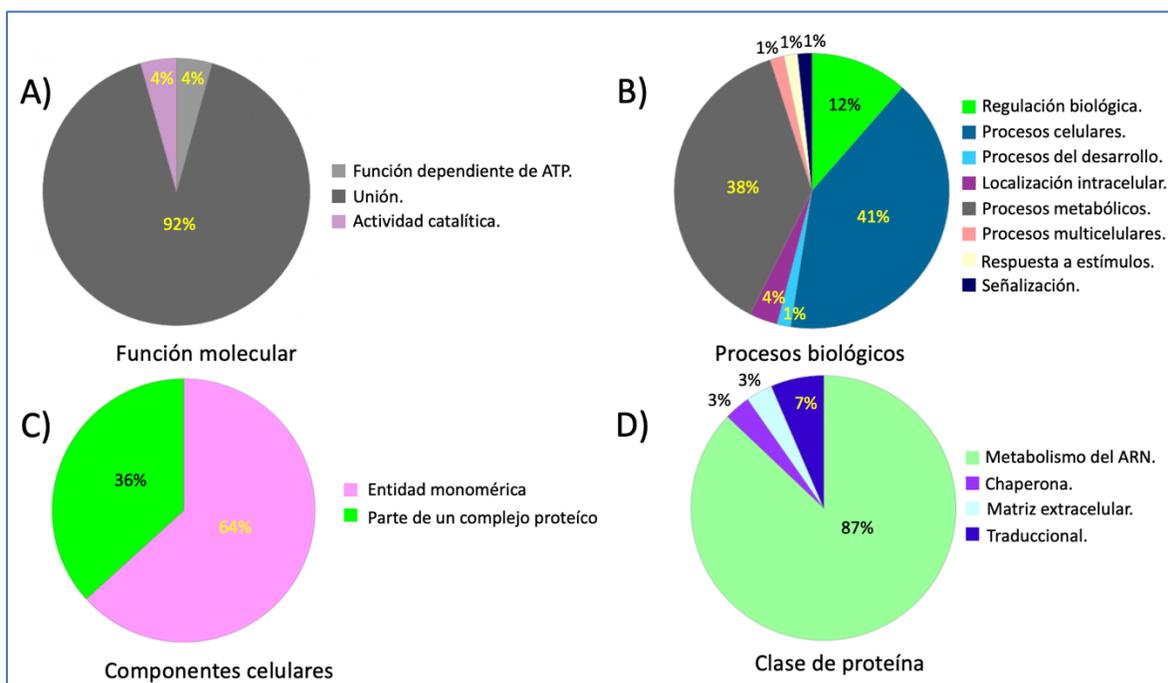


Figura 25.- Clasificación de las proteínas que interactúan con la RNT 3' de astrovirus no clásico VA1. Los gráficos de pastel muestran en el panel A) la clasificación con base en la función molecular de las proteínas. En el panel B) se muestra la clasificación con base en los procesos biológicos en los que están involucradas estas proteínas. En el panel C) se muestra la clasificación con base en su composición como componentes celulares, monoméricos o parte de complejos y finalmente en el panel D) se muestra la clasificación con base en su clase.

6.3.- Las RNT de los astrovirus clásicos y no clásicos interactúan con proteínas en común.

Una vez que se determinó la identidad de las proteínas unidas a cada RNT de ambos virus, se realizó una comparación para determinar cuántas y cuáles de las proteínas clasificadas como de unión a ARN son comunes.

En la figura 26 se muestra la distribución de las proteínas que se encontraron interaccionando con la RNT 5'. Se identificaron 26 proteínas en la RNT 5' de los astrovirus y 42 proteínas en los astrovirus no clásicos. Se comparten 20 proteínas entre ambas regiones.

En la figura 27 se muestra la distribución de las proteínas que se encontraron interaccionando con la RNT 3'. Se identificaron 47 proteínas en la RNT 3' de los astrovirus clásicos y 27 proteínas en los astrovirus no clásicos. Se comparten 29 proteínas entre ambas regiones.

Se encontraron 4 proteínas compartidas entre las RNT 5' y 3' de ambos astrovirus; una de ellas es la proteína PTBP1, que había sido anteriormente reportada previamente por el grupo de De Nova-Ocampo y colaboradores en 2019 para el astrovirus clásico 8. Aparte de PTBP1, tres proteínas no habían sido reportadas anteriormente en los astrovirus: PCBP, SRSF5 y DDX5. Otra proteína identificada en este análisis fue DDX23, la cual se encontró

interaccionando en la RNT 5' del astrovirus clásico 8. DDX23 fue previamente reportada en nuestro laboratorio por Murillo A. y colaboradores en 2015. La identificación de las proteínas que interaccionan en común con ambas RNT de los dos tipos de astrovirus abren la posibilidad de que estas proteínas pudiesen ser relevantes en los ciclos replicativos. Así mismo, la identificación de PTBP1 y DDX23 nos sugirió que el uso del ensayo RaPID es una técnica específica para detectar estas interacciones.

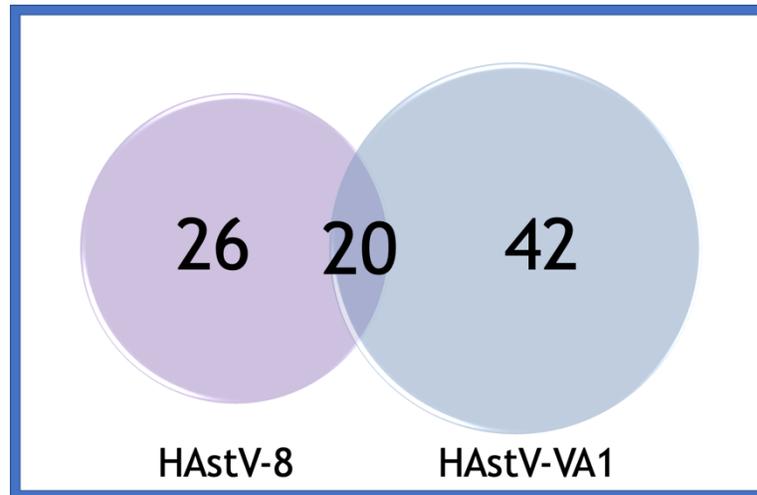


Figura 26.- Comparación de proteínas que interaccionan con la RNT 5' de astrovirus clásico 8 y no clásico VA1. Se muestra en un diagrama de Venn el número de proteínas que interaccionan con respecto a cada RNT.

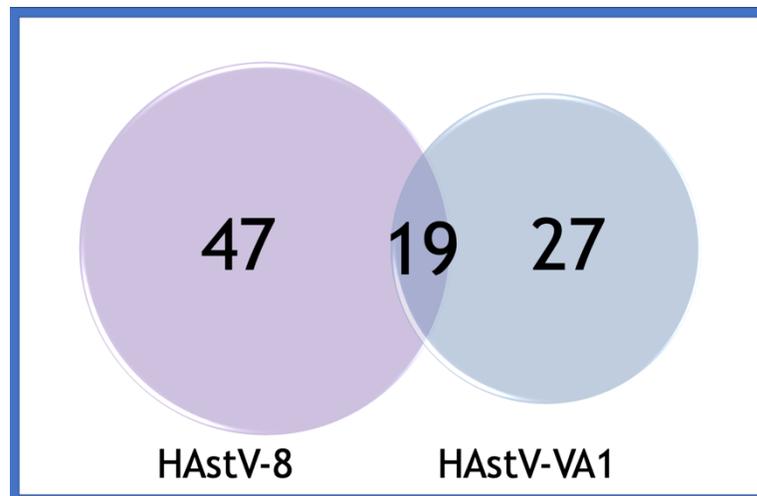


Figura 27.- Comparación de proteínas que interaccionan con la RNT 3' de astrovirus clásico 8 y no clásico VA1. Se muestra en un diagrama de Venn el número de proteínas que interaccionan con respecto a cada RNT.

Discusión

Los elementos reguladores presentan en las RNT 5' y 3' de los genomas y subgenomas de los virus de ARN. Son conocidos por desempeñar papeles indispensables en los procesos de replicación y traducción. La identificación de los componentes de los complejos de proteína-ARN, como ha sido mencionado anteriormente, representa una vía para conocer la biología molecular y los mecanismos virales, así como para desarrollar estrategias terapéuticas contra virus de interés. En el caso de astrovirus, se conoce muy poco acerca de las proteínas que podrían tener un papel en la replicación o la traducción durante la infección por este virus. Hasta la fecha solo existe un reporte acerca de una proteína asociada a las RNT estos virus, la proteína PTBP1, detectada por inmunoprecipitación y técnicas bioquímicas, así como la proteína PCBP por predicción bioinformática [De Nova-Ocampo M., *et al*, 2019].

El ensayo RaPID, utilizado en este trabajo, permitió la construcción de sondas que contienen las secuencias de las RNT 5' y 3' de dos astrovirus, uno clásico y uno no clásico, para la identificación de un gran número de proteínas asociadas. Al evaluar la especificidad de las sondas del ensayo RaPID, se corroboró que nucleolina, una proteína multifuncional de unión a ARN [Abdelmohsen K. & Gorospe M., 2012], se une a las sondas RaPID que contienen a las regiones de interés y al control. Nucleolina tiene una abundancia del 10% del contenido de proteína total celular y está localizada en diversos compartimentos de la célula [Tajrishi M., *et al*. 2011]. Nucleolina a nivel celular está involucrada en el metabolismo del ARN, en procesos como transcripción, ensamble del ribosoma, estabilidad del ARN, traducción y procesamiento de microARNs [Tonello, F. *et al*. 2022]. En las infecciones virales ha sido reportada participando a diferentes niveles: replicación en calicivirus felino [Cancio-Lonches C., *et al*. 2011], como receptor de entrada a la célula por el virus de la parainfluenza humana tipo 3 [Bose S., *et al*. 2004], y asociada a la traducción de poliovirus [Izumi R. *et al*. 2001]. Se ha reportado que nucleolina interactúa con el ARN mediante dominios conocidos como G-quadruplex (G4) [Kikin, *et al*. 2018]. Dado que nucleolina se unía a las sondas que contienen las RNT de los astrovirus y la sonda control, parecía tener una interacción inespecífica, por ello determinamos la posible presencia de regiones G4 en las sondas. Encontramos 29 regiones presentes en nuestra región control. Se ha reportado que nucleolina es una proteína relevante para las infecciones virales y hay antecedentes de que el grupo de De-Nova Ocampo predice de manera bioinformática que esta proteína pudiese unirse al ARN viral de los astrovirus [De Nova-Ocampo M., *et al*, 2019; Espinosa-Hernández W., *et al*, 2014]. Sin embargo, al haberla encontrado asociada en el control que no contiene regiones de interés, pero sí de interacción, poniendo en duda su interacción decidimos no incluirla en este trabajo. Estos resultados indican una captura fina y específica por las RBP en el sistema RaPID, aunque la presencia de las regiones G4 en la sonda RaPID representa una limitante a nuestro ensayo, ya que no permite determinar si nucleolina se une a las RNT de los astrovirus.

Durante la evaluación de la especificidad de las sondas del ensayo RaPID, se determinó la especificidad para no marcar proteínas de forma inespecífica, es decir que no se unen al ARN, y que por lo tanto no son biotiniladas, se asume que al no estarlo, no interactúan, ni son cercanas al rango máximo de proximidad de la nube de biotinilación, producida por la biotin ligasa del ensayo RaPID. Para demostrar esto, se observó que la proteína GADD

34 no se encontraba biotinilada. GADD34 es una proteína que tiende a formar un complejo con la proteína fosfatasa PP1 y eIF2 α . Este complejo reestablece las funciones de síntesis de proteínas a la célula después de que fue sometida a estrés [Choy M., et al. 2015]. La transcripción de GADD34 es inducida por la detención del crecimiento y daños en el ADN. GADD34 ha sido elegida ya que en nuestro laboratorio se ha demostrado que no tiene interacción con el ARN. Rojas M. y colaboradores en 2010 demostraron que, para la activación de eIF2 α , una proteína de unión a ARN, no es necesario el complejo formado por GADD34 y PP1, ya que no interaccionan con el ARN, ni con la proteína mencionada previamente. Ocegüera A. y colaboradores (2018), utilizaron el complejo de GADD34/PP1 como un control negativo de proteínas de unión a ARN al estudiar una estructura de esponja de ARN viral de rotavirus, lo que reforzó la idea de utilizarla como control negativo. GADD34 no presenta dominios de unión a ARN, por lo que no se encuentra presente en los ensayos de RaPID y no se encontró biotinilada. Esto indica que las sondas del ensayo RaPID permiten capturar específicamente proteínas de unión a ARN y no biotinila inespecíficamente. Si bien el ensayo reconoce proteínas como eIF3G, que no tienen dominios de unión a ARN, pero que interactúan directamente con las proteínas de unión a ARN. La base de Uniprot y la clasificación con Phanter las considera como parte de un complejo ARN-proteínas.

Durante el ensayo de RaPID-MS, se identificaron proteínas de unión a ARN que interaccionan con las RNT 5' y 3' de HAstV-8 y HAstV-VA1, lo cual arrojó una lista de 98 RBPs para los astrovirus clásicos HAstV-8 y 96 RBPs para los astrovirus no clásicos HAstV-VA1. Entre las proteínas identificadas se encontró a PTBP1 o PTB, reportada por el grupo de De-Nova Ocampo en 2019, reportada como una proteína de interacción con ambas RNTs del astrovirus clásico 8. Adicionalmente, en este trabajo se reporta la interacción de esta proteína con la RNT 5' del no clásico VA1. Se sabe que PTBP1 es una de las RBP del hospedero que forma parte relevante del ciclo replicativo de otros virus, como el calicivirus felino, donde actúa como un regulador entre el proceso de replicación y traducción [Karakasliotis I., et al. 2010], así como para el virus dengue, donde PTBP1 se asocia a la maquinaria de replicación [Anwar A., et al. 2009; Viktorovskaya O., et al. 2016]. Se ha demostrado también que su interacción con las estructuras secundarias de las RNT puede afectar la eficiencia del ciclo replicativo de poliovirus [Guest S., et al. 2004]. De igual forma, se encontró en este trabajo la proteína UPF1. La proteína UPF1 es antagonista a PTBP1, ambas se unen al ARN en el sitio de unión del tracto de polipirimidina (UCUU, UUCUCU) [May J., et al. 2020] y forman parte del mecanismo de regulación de degradación del ARN mensajero mediada por mutación terminadora (*non sense RNA decay*, de sus siglas en inglés), el cuál es un mecanismo celular para evitar la expresión de proteínas erróneas o con terminaciones prematuras. La unión de UPF1 al ARN causa el reclutamiento de la maquinaria de degradación [Karousis E. y Mühlemann O. 2022]. Actualmente no se conoce el papel de esta proteína en el ciclo replicativo de los astrovirus humanos, pero se sabe que interactúa con las RNT del astrovirus clásico 8 [De Nova-Ocampo M., et al, 2019; Espinosa-Hernández W., et al, 2014], adicionalmente se ha predicho bioinformáticamente la existencia de un sitio de unión del tracto de polipirimidina en las RNT del astrovirus clásico serotipo 8 [De Nova-Ocampo M., et al, 2019] y las RNT de los astrovirus porcinos del tipo 3 [Ferreira F., et al, 2021]. Con base en la literatura, es posible asumir dos funciones tentativas para PTBP1: 1) que la función de PTBP1 en los astrovirus humanos sería similar

al del virus del sarcoma de Rous, ya que se ha reportado que PTBP1 se une al ARN viral para evitar su degradación por el mecanismo non sense RNA decay, compitiendo por el sitio de unión con UPF1 [May J., *et al.* 2020]. 2) El rol de interruptor entre el proceso de replicación y traducción, como ocurre en calicivirus [Karakasiliotis I., *et al.* 2010]. Aunque cabe la posibilidad de que en los astrovirus tenga otra función distinta a las descritas anteriormente.

Otra de las proteínas identificadas fue la proteína PCBP, la cual es una proteína ampliamente distribuida en la célula y tiene múltiples funciones, de manera particular en el metabolismo del ARN [Kikin O., *et al.* 2006]. Las isoformas de PCBP: PCBP1 y PCBP2, han sido reportadas como abundantes en las células del epitelio del tracto gastrointestinal, tanto en núcleo como en citoplasma, lo que señala un papel relevante de estas proteínas en las células del sistema digestivo [Ghanem L., *et al.* 2014]. Hoy en día se han identificado y caracterizado ampliamente las isoformas de PCBP como importantes mediadores en la replicación de virus con tropismo gastrointestinal como poliovirus, donde participa en el switch entre la replicación y la traducción [Makeyev A., *et al.* 2002]. Adicionalmente ha sido reportada asociada al complejo de replicación de norovirus [Gutierrez-Escolano L., *et al.* 2000], y se ha descrito que está involucrada en la circularización del genoma del norovirus murino (MNV) como parte del mecanismo de la replicación de este virus. Actualmente no se conoce el papel de esta proteína en el ciclo replicativo de los astrovirus humanos, pero se ha predicho bioinformáticamente la existencia de un sitio de unión de PCBP a las RNT del ARN genómico del astrovirus clásico 8 por el grupo de De-Nova Ocampo en 2019 y en 2021 a las RNT del ARN genómico de los astrovirus porcinos del tipo 3 por Ferreira y colaboradores (2021). Podría ser que la función de PCBP en los astrovirus humanos sea similar a la de poliovirus, donde se ha demostrado que PCBP junto con la proteína viral 3CD, une a la RNT 5', reconociendo al ARN viral de poliovirus y lo protege, bloqueando a la maquinaria de degradación mediada por la exonucleasa Xrn-1 [Li N. y Nagy D. 2011].

Se identificaron diversas helicasas dependientes de ARN pertenecientes a la familia DDX, entre las cuales figura DDX23. La familia DDX es conocida por tener un papel relevante en el metabolismo del ARN, en la transcripción, la traducción, el decaimiento del ARN y el procesamiento de microARNs [Cheng W., *et al.* 2018]. La helicasa DDX5 se ha reportado que puede estar asociada a la replicación, ya que su silenciamiento puede inhibir la replicación viral en el caso de SARS-CoV-1 [Chen, J., *et al.* 2009]. En el caso del ciclo del virus de la hepatitis C, se demostró que DDX5 interacciona con la proteína viral NS5B, se ha asociado con la producción de copias del genoma viral y su interacción con la RNT 5', ya que al inhibirla se detenía la replicación viral [Harris, D., *et al.* 2006]. También se conoce que puede unirse a la RNT 3' del virus de la encefalitis japonesa, promoviendo la traducción y atenuando la replicación [Li C., *et al.* 2013]. Durante este trabajo se identificó la interacción de al menos 6 proteínas DDX diferentes, incluidas DDX5 y DDX23. Actualmente no se conoce el papel de DDX5 en el ciclo replicativo de los astrovirus humanos, pero podría asumirse que, con base en la literatura, que la función en los astrovirus humanos sería similar al de los ejemplos mencionados previamente, asociados al proceso de replicación o traducción. En el caso de la helicasa DDX23, esta ya había sido previamente reportada en nuestro laboratorio por Murillo y colaboradores en 2015. Durante el estudio de Murillo se analizaron e identificaron algunos componentes de los complejos de replicación de

astrovirus clásico 8 asociados a membranas. Al silenciar DDX23 utilizando ARNs de interferencia, se demostró que baja en alrededor de un 35% el título viral en células Caco2 infectadas con astrovirus clásico 8 [Murillo A., *et al.* 2015]. A la fecha no se ha reportado a DDX23 en asociación con otros ciclos replicativos virales, lo que lo hace un factor de interés para continuar estudiando su papel en la infección por astrovirus humanos clásicos y no clásicos, ya que esta proteína también se encontró asociada a estos últimos.

Otras de las proteínas identificadas fueron los factores de empalme ricos en regiones de serina y arginina o proteínas SRSF. Las SRSF son proteínas pertenecientes a la maquinaria de corte y empalme del ARN con diversas funciones regulatorias en interacciones de tipo ARN-proteína, proteína-proteína, transporte nuclear, reclutamiento y formación de motas nucleares [Cascarina S. y Ross E., 2022]. Actualmente no se conoce el papel de esta proteína en el ciclo replicativo de los astrovirus humanos, pero se conoce que interactúa de manera indirecta, relocalizándose en el citoplasma e interactuando con PCBP para estimular la traducción de poliovirus [Álvarez E., *et al.* 2013] y coxsackievirus B3 [Fitzgerald, K., *et al.* 2013]. También se conoce que juegan un papel en el empalme alternativo del ARN durante infecciones con virus de distintos tipos de material genómico [Boudreault, S., *et al.* 2019]. Podría proponerse que, con los antecedentes previamente descritos, la función de estas SRSF en los astrovirus humanos sería similar al de los ejemplos mencionados previamente. Las SRSF podrían estar asociadas al proceso de traducción y relocalización de componentes celulares. Se ha predicho bioinformáticamente la existencia de sitios de unión de SRSF5 y SRSF6 en las RNT del ARN del astrovirus clásico 8 por el grupo de De-Nova Ocampo en 2019 y en 2021 fue predicho para las RNT de los astrovirus porcinos del tipo 3 por Ferreira y colaboradores (2021), lo que lo hace un factor de interés para estudiar posteriormente.

Durante el análisis de las proteínas de unión a ARN y su relación con las secuencias de las RNT, se observó que el número de proteínas asociadas a las distintas RNT de los dos tipos de astrovirus no está asociada al tamaño de las RNT, ni con las distintas conformaciones de sus estructuras secundarias. En el caso del astrovirus clásico 8, el tamaño de la RNT 5' es de 81 nucleótidos y se identificaron 46 proteínas que interactúan en esta región. La región RNT 3' tiene un tamaño de 86 nucleótidos y se identificaron 66 RBPs. En el caso del astrovirus no clásico VA1, el tamaño de su RNT 5' es de 38 nucleótidos y se identificaron 62 proteínas interactuando con esta región. En el caso de su RNT 3', el tamaño es de 111 nucleótidos y recluta 46 RBPs.

De acuerdo con los tamaños de las RNT de los astrovirus clásicos y el número de proteínas de unión a ARN, se compararon las secuencias y tamaños de todas las secuencias de RNT reportadas para los 8 serotipos de astrovirus clásicos, teniendo como referencia comparativa el astrovirus clásico 8, el usado en los ensayos de este trabajo. Se determinó que el tamaño de la secuencia de la RNT 5' es muy similar a la de los demás astrovirus, aproximadamente de 80 nucleótidos, y presenta una diferencia del 74% en su secuencia. Se determinó que los cambios en tamaño y secuencia impactan la predicción de estructuras secundarias. Se determinó que en las estructuras tallo-asa de la estructura secundaria existen sitios conservados, los cuales son análogos a los encontrados en predicciones bioinformáticas en los astrovirus porcinos del tipo 3 [Ferreira F., *et al.* 2021]. Uno de los

sitios identificados para los astrovirus clásicos del serotipo 1 al 8 fue el tipo tracto de polipirimidina (UUU, UUUG), el cual corresponde al sitio de unión para la proteína PTBP1 y UPF1. Para la RNT 3', se determinó que el tamaño es muy similar a la de los demás astrovirus, aproximadamente de 86 nucleótidos y presenta una diferencia del 64% en su secuencia. Se determinó que la RNT 3' de los astrovirus clásicos es distinta en sus estructuras secundarias, así como en la cantidad y secuencia de las estructuras de tallo-asa. De igual manera para la RNT 5', se buscaron sitios de unión a RBPs en estructuras con sitios conservados, y se determinó que en la RNT 3' de los astrovirus clásicos del serotipo del 1 al 8 existe una región conservada de unión de proteínas SRSF5 y 6 (UACAG), predicha por Ferreira y colaboradores en 2021. También se determinó que para los astrovirus clásicos serotipo 3, 4, 6, 7 y 8 existe un sitio del tipo tracto de polipirimidina (UCUU), el cuál corresponde al sitio de unión para la proteína PTBP1 y UPF1.

Para los astrovirus no clásicos, se realizó el análisis detallado anteriormente y se usó como referencia comparativa el astrovirus no clásico VA1, usado en los ensayos de este trabajo. Se determinó que el largo de la secuencia de la RNT 5' es diferente entre todos los tipos de astrovirus no clásicos: VA1-4, MLB 1-3, Pune y BF34, que van desde los 38 hasta alrededor de 90 nucleótidos de largo y presenta una diferencia desde el 23 hasta el 86% en su secuencia. Debido a las diferencias de tamaño y secuencia forman estructuras secundarias distintas en su composición de estructuras tallo-asa. Se determinó que en las estructuras tallo-asa existen sitios conservados, los cuales son análogos a los encontrados en predicciones bioinformáticas en los astrovirus porcinos del tipo 3 [Ferreira F., *et al*, 2021]. Uno de los sitios identificados para los astrovirus para la RNT 5' de los astrovirus no clásicos tipo Pune, VA1 y VA2, fue el tipo tracto de polipirimidina (UUU, UUUG), el cual corresponde al sitio de unión para la proteína PTBP1 y UPF1. Para la RNT 3', se determinó que son distintas en tamaño y su secuencia es muy diferente entre ellos, de alrededor del 34% de similitud. Esto refleja que se formen estructuras secundarias con diferentes composiciones en sus estructuras tallo-asa. Se determinó de igual manera la existencia de sitios conservados en la RNT 3' de los astrovirus no clásicos tipo VA1, VA5 y BF34, fue una región conservada de unión de proteínas SRSF5/6 (UACAG).

De acuerdo con los datos obtenidos del análisis de las proteínas de unión a ARN y su relación con las secuencias de las RNT, en este trabajo se reportan 194 proteínas asociadas a las RNT de dos tipos de astrovirus de importancia epidemiológica, clásico 8 y no clásico VA1. Adicionalmente se determinó la presencia de sitios de unión de las RBPs reportadas en este trabajo en otros serotipos y tipos de astrovirus, encontrándose algunos sitios comunes, lo que abre una ventana a la probable importancia de algunas de las proteínas en los ciclos replicativos de los distintos tipos y serotipos de astrovirus humanos.

Conclusiones

En la actualidad, no se ha descrito completamente el ciclo replicativo de los astrovirus y las proteínas del huésped que secuestra para realizarlo. En esta tesis, la identificación de algunas de las proteínas que pudieran estar interactuando con las regiones no traducidas de ARN genómicos de los astrovirus humanos clásicos y no clásicos contribuirá en ello.

- El ensayo RaPID permitió de manera selectiva marcar con biotina y capturar por afinidad las proteínas que interactúan con las sondas de ARN de interés, esto fue comprobado mediante la caracterización de RaPID.

- A pesar de la afinidad a RBPs, el sistema RaPID tiene la desventaja de capturar algunas proteínas como Nucleolina, cuando no hay una región de interés clonada, siendo una limitante del sistema. Esta limitante fue compensada con la construcción de un vector RaPID sin región de interés clonada.

- Entre las proteínas identificadas se encontraron 5 proteínas que interactúan en ambos tipos de astrovirus humanos: DDX5, SRSF5, PCBP, PTBP1 y UPF1. Estas proteínas ya se ha reportado su interacción con las regiones no traducidas de otros virus con genoma de ARN, sumando a los astrovirus a esta lista de reportes.

- En la identificación por espectrometría de masas, se encontraron de manera bioinformática posibles sitios que han sido reportados para la unión de estas proteínas al ARN viral, sustentando nuestros hallazgos.

Perspectivas

A partir de los estudios y discusiones presentados en esta tesis, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en:

- Determinar la posible participación de las proteínas identificadas en la replicación de los astrovirus humanos.

- Determinar el paso del ciclo replicativo regulado por las proteínas identificadas.

- Determinar mecanismos comunes y diferenciales relacionados a las proteínas funcionales de unión a ARN

Referencias

- Abdelmohsen K. y Gorospe M. RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biology* 2012. 9(6). <https://doi.org/10.4161/rna.19718>
- Abyntek. "Inmunoprecipitación: 7 claves para un ensayo exitoso" (2018). Consultado el día 25 de abril 2022 a las 22:30 en la dirección: <https://www.abyntek.com/inmunoprecipitacion-claves/> .
- Aguilera-Flores C., López T., Zamudio F., Sandoval-Jaime C., Pérez I., López S., DuBois R., Arias C. The Capsid Precursor Protein of Astrovirus VA1 Is Proteolytically Processed Intracellularly. *Journal of Virology* 2022. 96(14). <https://doi.org/10.1128/jvi.00665-22>
- Aktas O., Aydin H., Timurkan M. A molecular study on the prevalence and coinfections of rotavirus, norovirus, astrovirus and adenovirus in children with gastroenteritis. *Minerva Pediatrica* 2019, 71: 431-437. <http://dx.doi.org/10.23736/S0026-4946.16.04304-X>
- Alvarez D., Filomatori C., Gamarnik A. Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. *Virology* 2008. 25;375(1):223-235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.014>
- Álvarez E., Castelló A., Carrasco L., Izquierdo J. Poliovirus 2A Protease Triggers a Selective Nucleo-Cytoplasmic Redistribution of Splicing Factors to Regulate Alternative Pre-mRNA Splicing. *PLoS ONE* 2013. 8(9): e73723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073723>
- Anwar A., Leong K., Ng M., Chu J., Garcia-Blanco M. The polypyrimidine tract-binding protein is required for efficient dengue virus propagation and associates with the viral replication machinery. *Journal of Biological Chemistry* 2009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.006239>
- Arias C., y DuBois R. The Astrovirus Capsid: A Review. *Viruses* 2017. 9(1):15. <https://doi.org/10.3390/v9010015>
- Benchling [Biology Software]. (2021). Ubicado en: <https://benchling.com>
- Brown J., Morfopoulou S., Hubb J., Emmett W., Ip W., Shah D., Brooks T., Paine S., Anderson G., Virasami A., Tong C., Clark D., Plagnol V., Jacques T., Qasim W., Hubank M., Breuer J. Astrovirus VA1/HMO-C: an increasingly recognized neurotropic pathogen in immunocompromised patients. *Clinical Infectious Diseases*. 2015. 15;60(6):881-8. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu940>
- Bose S., Basu M., Banerjee A. Role of Nucleolin in Human Parainfluenza Virus Type 3 Infection of Human Lung Epithelial Cells. *Journal of Virology* 2004. 78(15): 8146–8158. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8146-8158.2004>
- Bosch A., Pintó RM., Guix S. Human astroviruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2014. 27(4):1048-74. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-14>

- Boudreault S., Roy P., Lemay G., Bisailon M. Viral modulation of cellular RNA alternative splicing: A new key player in virus–host interactions? *WIREs RNA*. 2019; 10:e1543. <https://doi.org/10.1002/wrna.1543>
- Burbelo P., Ching K., Esper F, Iadarola M., Delwart E., Lipkin W., Kapoor A. Serological studies confirm the novel astrovirus HMOAstV-C as a highly prevalent human infectious agent. *PLoS One* 2011. 6(8):e22576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022576>
- Cancio-Lonches C., Yocupicio-Monroy, M. Sandoval-Jaime, C. Galvan-Mendoza, I. Urena, L. Vashist, S. Goodfellow, I. Salas-Benito, J. Gutierrez-Escolano, A.L. Nucleolin interacts with the feline calicivirus 3' untranslated region and the protease-polymerase NS6 and NS7 proteins, playing a role in virus replication. *Journal of Virology* 2011. 85: 8056-8068. <https://doi.org/10.1128/JVI.01878-10>
- Cardarelli F., Digiacoimo L., Marchini C. The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Scientific Reports* 2016, 6, 25879. <https://doi.org/10.1038/srep25879>
- Cascarina S. y Ross E. Expansion and functional analysis of the SR-related protein family across the domains of life. *RNA* 2022. 28: 1298-1314. <https://doi.org/10.1261/ma.079170.122>
- Chen J., Chen W., Poon K., Zheng B., Lin X., Wang Y., Wen Y. Interaction between SARS-CoV helicase and a multifunctional cellular protein (Ddx5) revealed by yeast and mammalian cell two-hybrid systems. *Archives of Virology* 2009. 154, 507–512. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0323-y>
- Cheng W., Chen G., Jia H., He X., Jing Z. DDX5 RNA Helicases: Emerging Roles in Viral Infection. *International Journal of Molecular Sciences* 2018; 19(4):1122. <https://doi.org/10.3390/ijms19041122>
- Choy M., Yusoff P., Lee I., Newton J., Goh C., Page R., Shenolikar S., Peti W. Structural and Functional Analysis of the GADD34:PP1 eIF2 α Phosphatase. *Cell Reports* 2015, 11: 1885–1891. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.043>
- Cordey S., Brito F., Vu D., Turin L., Kilowoko M., Kyungu E., Genton B., Zdobnov E., D'Acremont V., Kaiser L. Astrovirus VA1 Identified by Next-generation Sequencing in a Nasopharyngeal Specimen of a Febrile Tanzanian Child with Acute Respiratory Disease of Unknown Etiology. *Emerging Microbes & Infections* 2016. 5:1, 1. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.98>
- Cristea I., Carroll J., Rout M., Rice C., Chait B., MacDonald M. Tracking and elucidating alphavirus-host protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* 2006. 281(40):30269–78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603980200>
- Cytiva. “Western Blotting Handbook 2022”. En Protein Analysis Collection. 2022. En la dirección: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/support/handbooks> .

- Daniel-Wayman S., Fahle G., Palmore T., Green K., Prevots DR. Norovirus, astrovirus, and sapovirus among immunocompromised patients at a tertiary care research hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2018, 92: 143-146. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.017>
- De Nova-Ocampo M., Soliman M., Espinosa-Hernández W., Velez-del Valle C., Salas-Benito J., Valdés-Flores J., García-Morales L. Human astroviruses: in silico analysis of the untranslated region and putative binding sites of cellular proteins. *Molecular Biology Reports* 2019, 46: 1413–1424. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4498-8>
- Dhillon P., Tandra V., Chorghade S., Namsa N., Sahoo L., Rao D. Cytoplasmic Relocalization and Colocalization with Viroplasms of Host Cell Proteins, and Their Role in Rotavirus Infection. *Journal of Virology* 2018. 92 (15): 612-618. <https://doi.org/10.1128/JVI.00612-18>
- Donelli G., Superti F., Tinari A., Marziano M. Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells. *Journal of Medical Virology* 1992. 38(4):271–7. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890380408>
- Eng J., Fischer B., Grossmann J., MacCoss M. A Fast SEQUEST Cross Correlation Algorithm. *Journal of Proteome Research* 2008. 7, 10, 4598–4602. <https://doi.org/10.1021/pr800420s>
- Espinosa-Hernández W., Velez-Uriza D., Valdés J., Vélez-Del Valle C., Salas-Benito J., Martínez-Contreras R., García-Espítia M., Salas-Benito M., Vega-Almeida T., De Nova-Ocampo M. PTB Binds to the 3' Untranslated Region of the Human Astrovirus Type 8: A Possible Role in Viral Replication. *PLoS ONE*, 2014. 9 (11): e113113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113113>
- Ferreira F., Harmon K., Bradner L., Burrough E., Derscheid R., Magstadt D., Michael A., Nunes de Almeida M., Schumacher L., Siepker C., Sitthicharoenchai P., Stevenson G., Arruda B. Comparative Analysis of Novel Strains of Porcine Astrovirus Type 3 in the USA. *Viruses* 2021, 13:1859. <https://doi.org/10.3390/v13091859>
- Finkbeiner S., Li Y., Ruone S., Conrardy C., Gregoricus N., Toney D., Virgin W., Anderson L., Vinjé J., Wang D., Tong S. Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *Virology* 2009. 83(20):10836-9. <https://doi.org/10.1128/JVI.00998-09>
- Fischer K., Pinho Dos Reis V., Balkema-Buschmann, A. Bat Astroviruses: Towards Understanding the Transmission Dynamics of a Neglected Virus Family. *Viruses* 2017, 9, 34. <https://doi.org/10.3390/v9020034>
- Fitzgerald D., Chase J., Cathcart L., Tran P., Semler B. Viral proteinase requirements for the nucleocytoplasmic relocalization of cellular splicing factor SRp20 during Picornavirus infections. *Journal of Virology* 2013. 87(5), 2390–2400. <https://doi.org/10.1128/JVI.02396-12>

- Flynn R., Belk J., Qi Y., Yasumoto Y., Wei J., Alfajaro M., Shi Q., Mumbach M., Limaye A., DeWeirdt P., Schmitz C., Parker K., Woo E., Chang H., Horvath T., Carette J., Bertozzi C., Wilen C., Satpathy A. Discovery and functional interrogation of SARS-CoV-2 RNA-host protein interactions. *Cell* 2021. 184:2394–2411.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.012>.
- Fuentes C., Guix S., Bosch A., Pintó R. The C-terminal nsP1a protein of human astrovirus is a phosphoprotein that interacts with the viral polymerase. *Journal of Virology* 2011. 85(9):4470–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.01515-10>
- Gibson C., Chen J., Monroe S., Denison M. (1998) Expression and processing of nonstructural proteins of the human astroviruses. En: Enjuanes L., Siddell S.G., Spaan W. (eds) *Coronaviruses and Arteriviruses. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 440. Ed. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5331-1_50
- Ghanem L., Chatterji P, Liebhaber S. Specific enrichment of the RNA-binding proteins PCBP1 and PCBP2 in chief cells of the murine gastric mucosa. *Gene Expression Patterns* 2014. 14(2):78-87. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2014.01.004>
- Guest S., Pilipenko E., Sharma K., Chumakov K., Roos P. Molecular mechanisms of attenuation of the Sabin strain of poliovirus type 3. *Journal of Virology* 2004. 78: 11097–11107. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11097-11107.2004>
- Gutierrez-Escolano L., Brito Z., del Angel R., Jiang X. Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *Journal of Virology* 2000. 74 (18): 8558-8562. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.18.8558-8562.2000>
- Hargest V., Davis A., Schultz-Cherry S: Astroviruses (*Astroviridae*) en *Encyclopedia of Virology* 2021, Edición 4, Volumen 2. 92-99. Editorial Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20997-7>
- Harris, D., Zhang, Z., Chaubey, B., Pandey, V. Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Molecular and Cellular Proteomics* 2006, 5, 1006–1018. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500429-MCP200>
- Herbert T., Brierley I., Brown T. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *Journal of General Virology* 1997. 78(Pt 5):1033–40. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-5-1033>
- Hernández J. (2021). *Estudio de la participación de XNR2 y Nucleolina durante el ciclo replicativo de Rotavirus*. [Tesis de maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hollander M., Zhan Q., Bae I., Fornace A. Mammalian GADD34, an Apoptosis- and DNA Damage-inducible Gene. *Journal of Biological Chemistry* 1997. 272(21): 13731-13737. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13731>
- Hoshino Y., Zimmer J., Moise N., Scott F. Detection of astroviruses in feces of a cat with diarrhea. *Archives of Virology* 1981. 70, 373–376. <https://doi.org/10.1007/BF01320252>

- Huang Y. y Lai C. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 binds to the 3'-untranslated region and mediates potential 5'-3'-end cross talks of mouse hepatitis virus RNA. *Journal of Virology* 2001. 75 (11), 5009-5017. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.041>
- Imada T., Yamaguchi S., Mase M., Tsukamoto K., Kubo M., Morooka A. Avian Nephritis Virus (ANV) as a New Member of the Family Astroviridae and Construction of Infectious ANV cDNA. *Journal of Virology* 2000. 74, 8487-8493. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.18.8487-8493.2000>
- Isken O., Grassmann C., Yu H., Behrens S.E. Complex signals in the genomic 3' nontranslated region of bovine viral diarrhea virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *RNA* 2006. 10(10), 1637-1652. <https://doi.org/10.1261/rna.7290904>
- Isken O., Baroth M., Grassmann C., Weinlich S., Ostareck D., Ostareck-Lederer A., Behrens S. Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication. *RNA* 2007. 13, 1675-1692. <https://doi.org/10.1261/rna.594207>
- Izumi R., Valdez B., Banerjee R., Srivastava M., Dasgupta A. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Research* 2001; 76:17 – 29. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00240-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00240-4)
- Jang S., Jeong W., Kim M., Lee Y., Lee J., Lee G., Paik S., Koh G., Kim J., Lee C. Detection of replicating negative-sense RNAs in CaCo-2 cells infected with human astrovirus. *Archives of Virology* 2010. 155(9):1383-9. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0718-9>
- Janowski A., Bauer I., Holtz L., Wang D. Propagation of Astrovirus VA1, a Neurotropic Human Astrovirus, in Cell Culture. *Journal of Virology* 2017. 91(19). <https://doi.org/10.1128/JVI.00740-17>
- Janowski A. Beyond the Gastrointestinal Tract: The Emerging and Diverse Tissue Tropisms of Astroviruses. *Viruses* 2021, 13:732. <https://dx.doi.org/10.3390/v13050732>
- Jiang B., Monroe S., Koonin E., Stine S., Glass R. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993. 90(22):10539-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.1053>
- Jiang H., Holtz L., Bauer I., Franz C., Zhao G., Bodhidatta L., Shrestha S., Kang G., Wang D. Comparison of novel MLB-clade, VA-clade and classic human astroviruses highlights constrained evolution of the classic human astrovirus nonstructural genes. *Virology* 2013, 436: 8-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.040>
- Jo J. y Tabata Y. Non-viral gene transfection technologies for genetic engineering of stem cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008. 68(1):90-104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.04.021>
- Karakasiliotis I., Vashist S, Bailey D, Abente EJ, Green KY, Roberts LO., Sosnovtsev S., Goodfellow I. Polypyrimidine Tract Binding Protein Functions as a Negative Regulator of

Feline Calicivirus Translation. *PLoS ONE* 2010. 5(3): e9562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009562>

- Karousis E. y Mühlemann O. The broader sense of nonsense. *Trends of Biochemical Sciences* 2022. 47(11):921-935. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.06.003>

- Kapoor A., Li L., Victoria J., Oderinde B., Mason C., Pandey P., Zaidi S., Delwart E. Multiple novel astrovirus species in human stool. *Journal of General Virology* 2009, 90: 2965-2972. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.014449-0>

- Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*. 2007. Jul;35 (Web Server issue): W43-6. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm234n>

- Kiang D. y Matsui S. Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural protein. *Journal of General Virology* 2002. 83(Pt 1):25–34. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-1-25>

- Kikin O., D'Antonio L., Bagga PS. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research* 2006. 1;34. <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl253>

- Lago S., Lago S, Tosoni E, Nadai M, Palumbo M, Richter SN. The cellular protein nucleolin preferentially binds long-looped G-quadruplex nucleic acids. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2017. 1861(5 Pt B):1371-1381. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.036>

- Lauber C., Seifert M., Bartenschlager R., Seitz S. Discovery of Highly Divergent Lineages of Plant-associated Astro-like Viruses Sheds Light on the Emergence of Potyviruses. *Virus Research* 2019. 260, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.11.009>

- Lee, T. y Kurtz, J. Serial Propagation of Astrovirus in Tissue Culture with the Aid of Trypsin. *Journal of General Virology* 1981. 57, 421–424. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-57-2-421>

- Lewis T., Greenberg H., Herrmann J., Smith L., Matsui S. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. *Journal of Virology* 1994. 68(1):77–83. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.1.77-83.1994>

- Li C., Ge, L., Li, P., Wang, Y., Sun, M., Huang, L., Ishag, H., Di, D., Shen, Z., Fan, W., Mao X. The DEAD-box RNA helicase DDX5 acts as a positive regulator of Japanese encephalitis virus replication by binding to viral 3' UTR. *Antiviral Research* 2013, 100, 487–499. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.002>

- Li Z. y Nagy P. Diverse roles of host RNA binding proteins in RNA virus replication. *RNA Biology* 2011, 8: 305-315. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.15391>

- Liu Y., Wimmer E., Paul A. Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010. 1789:495–517. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.09.007>

- Lista M., Martins R., Billant O. Nucleolin directly mediates Epstein-Barr virus immune evasion through binding to G-quadruplexes of EBNA1 mRNA. *Nature Communications* 2017. 8, 16043. <https://doi.org/10.1038/ncomms16043>
- López-Ulloa B., Fuentes Y., Pizarro-Ortega M., López-Lastra M. RNA-Binding Proteins as Regulators of Internal Initiation of Viral mRNA Translation. *Viruses* 2022, 14, 188. <https://doi.org/10.3390/v14020188>
- Ma J., Fan Y., Zhou Y., Liu W., Jiang N., Zhang J., Zeng L. Efficient resistance to grass carp reovirus infection in JAM-A knockout cells using CRISPR/Cas9. *Fish & Shellfish Immunology* 2018. 76:206-215. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.039>
- Madeira F., Park Y., Lee J., Buso N, Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A., Potter S., Finn R., Lopez R. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research* 2019. 47-W1: W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Makeyev A., Eastmond D., Liehaber S. Targeting a KH-domain protein with RNA decoys. *RNA* 2002. 8(9):1160-73. <https://doi.org/10.1017/s135583820202808x>
- Mattison C., Dunn M., Wikswo M., Kambhampati A., Calderwood L., Balachandran N., Burnett E., Hall A. Non-Norovirus Viral Gastroenteritis Outbreaks Reported to the National Outbreak Reporting System, USA, 2009–2018. *Emerging Infectious Diseases* 2021. 27(2):560-564. <https://doi.org/10.3201/eid2702.203943>.
- May J., Johnson P., Ilyas M., Gao F., Simon A. The Multifunctional Long-Distance Movement Protein of Pea Enation Mosaic Virus 2 Protects Viral and Host Transcripts from Nonsense-Mediated Decay. *mBio* 2020. 11(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00204-20>
- McKnight K. y Lemon S. Hepatitis A Virus Genome Organization and Replication Strategy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2018. 8:a033480. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033480>
- Méndez-Toss M., Romero-Guido P., Munguía M., Méndez E., Arias C. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. *Journal of general virology* 2000, 81: 2891–2897. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-2891>
- Méndez E., Salas-Ocampo M., Munguía E., Arias C. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. *Journal of Virology* 2003;77(21):11378–84. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.21.11378-11384.2003>
- Méndez E., Murillo A., Velázquez R., Burnham A., Arias C.F. (2012) Replication Cycle of Astroviruses. In: Schultz-Cherry S. (eds) *Astrovirus Research*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4735-1_2
- Mellacheruvu D., Wright Z., Couzens A., Lambert J., St-Denis N., Li T., Miteva Y., Hauri S., Sardu M., Low T., Halim V., Bagshaw R., Hubner N., Hakim A., Bouchard A., Faubert D., Fermin D., Dunham W., Goudreault M., Lin Z., Badillo B., Pawson T., Durocher D., Coulombe B., Aebersold R., Furga G., Colinge J., Heck A., Choi H., Gstaiger M., Mohammed

S., Cristea I., Bennett K., Washburn M., Raught B., Ewing R., Gingras B., Nesvizhskii A. The CRAPome: a Contaminant Repository for Affinity Purification Mass Spectrometry Data. *Nature Methods* 2013. 10, 730–736. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2557>

- Mi H., Muruganujan A., Huang X., Ebert D., Mills C., Guo X., Thomas P. Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nature Protocols* 2019. 14(3):703-721. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0128-8>

- Midthun K., Greenberg H., Kurtz J., Gary G., Lin F., Kapikian A. Characterization and Seroepidemiology of a Type 5 Astrovirus Associated with an Outbreak of Gastroenteritis in Marin County, California. *Journal of Clinical Microbiology* 1993. 31, 955–962. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.4.955-962.1993>

- Monceyron C., Grinde B., Jonassen T. Molecular characterization of the 3'-end of the astrovirus genome. *Archives of Virology* 1997, 142: 699-706. <http://dx.doi.org/10.1007/s007050050112>

- Monroe S., Stine S., Gorelkin L., Herrmann J., Blacklow N., Glass R. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. *Journal of Virology* 1991. 65(2):641–8. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.2.641-648.1991>

- Moser L. y Schultz-Cherry S. Suppression of astrovirus replication by an ERK1/2 inhibitor. *Journal of Virology* 2008. 82(15):7475–82. <https://doi.org/10.1128/JVI.02193-07>

- Murillo A., Vera-Estrella R., Barkla J, Méndez E, Arias C. Identification of Host Cell Factors Associated with Astrovirus Replication in Caco-2 Cells. *Journal of Virology* 2015. 89(20):10359-70. <https://doi.org/10.1128/JVI.01225-15>

- Muth T., Vaudel M., Barsnes H., Martens L., Sickmann A. XTandem Parser an open-source library to parse and analyse X!Tandem MS/MS search results. *Proteomics* 2010 10(7):1522-4. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900759>

- Nagaswamy U., Larios-Sanz M., Hury J., Collins S., Zhang Z., Zhao Q., Fox G. NCIR: a database of non-canonical interactions in known RNA structures. *Nucleic Acids Research* 2002. 30(1): 395–397. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/30.1.395>

- NEB. “BsmBI-v2”. Consultado el día 25 de noviembre 2021 a las 9:30 en la dirección: <https://international.neb.com/products/r0739-bsmbi-v2#Product%20Information>

- Notredame C., Higgins D., Heringa J. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* 2000, 302(1), 205–217. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>

- Ocegüera A., Peralta A., Martínez-Delgado G., Arias C., López S. Rotavirus RNAs sponge host cell RNA binding proteins and interfere with their subcellular localization. *Virology* 2018. 525, 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.09.013>

- Oude-Munnink B., Cotten, M., Canuti, M., Deijs, M., Jebbink, M., van Hemert, F., Phan, M., Bakker, M., Jazaeri Farsani, S., Kellam, P., van der Hoek L. A Novel Astrovirus-Like

RNA Virus Detected in Human Stool. *Virus Evolution* 2016. 2, vew005. <https://doi.org/10.1093/ve/vew005>

- Pronobis M., Deutch N., Peifer M. The Miraprep: A Protocol that Uses a Miniprep Kit and Provides Maxiprep Yields. *PLoS ONE* 2016. 11(8): e0160509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160509>

- Quan P., Wagner T., Briese T., Torgerson T., Hornig M., Tashmukhamedova A., Firth C., Palacios G., Baisre-De-Leon A., Paddock C., Hutchison S., Egholm M., Zaki S., Goldman J., Ochs H., Lipkin W. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerging infectious diseases* 2010. 16(6):918-25. <https://doi.org/10.3201/eid1606.091536>

- Ramanathan M., Majzoub K., Rao D., Neela P., Zarnegar B., Mondal S., Roth J., Gai H., Kovalski J., Siprashvili Z., Palmer T., Carette J., Khavari P. RNA-protein interaction detection in living cells. *Nature Methods* 2018, 15: 207–212. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4601>

- Ramanathan M., Porter D., Khavari P. Methods to study RNA-protein interactions. *Nature Methods* 2019, 16(3):225-234. <https://doi.org/s41592-019-0330-1>

- Rangan R., Zheludev I., Hagey R., Pham E., Wayment-Steele H., Glenn J., Das R. RNA genome conservation and secondary structure in SARS-CoV-2 and SARS-related viruses: a first look. *RNA* 2020, 26: 937–959. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.076141.120>

- Rawal G., Ferreyra F., Macedo N., Bradner L., Harmon K., Allison G., Linhares D, Arruda B. Ecology of Porcine Astrovirus Type 3 in a Herd with Associated Neurologic Disease. *Viruses* 2020, 12, 992. <https://doi.org/10.3390/v12090992>

- Reuter G., Pankovics P., Boros A. Nonsuppurative (Aseptic) Meningoencephalomyelitis Associated with Neurovirulent Astrovirus Infections in Humans and Animals. *Clinical Microbiology Reviews* 2018. 31. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-18>

- Rojas M., Arias C., López S. Protein kinase R is responsible for the phosphorylation of eIF2alpha in rotavirus infection. *Journal of Virology* 2010. 84(20):10457-66. <https://doi.org/10.1128/JVI.00625-10>

- Sandoval-Jaime C. Astrovirus reverse genetics systems, a story of success: *Current Opinion in Virology* 2020, 44: 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.06.009>

- Sandoval-Jaime C., Guzmán-Ruiz L., López S. y Arias C. Development of a novel DNA based reverse genetics system for classic human astroviruses. *Virology* 2019. 535: 130-135. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.07.005>

- Sandoval-Jaime C., Gutiérrez-Escolano A. Cellular proteins mediate 5'–3' end contacts of Norwalk virus genomic RNA. *Virology* 2009. 387 (2): 322-330. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.041>

- Sato K., Akiyama M., Sakakibara Y. RNA secondary structure prediction using deep learning with thermodynamic integration. *Nature Communications* 2021. 12, 941. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21194-4>
- Santacruz Biotechnology. "GADD 34 Anticuerpo (B-10): sc-373815". Consultado el día 28 de mayo 2022 a las 10:44 en la dirección: <https://datasheets.scbt.com/sc-373815.pdf>
- Shivaprasad S., Weng K., Ooi Y., Belk J., Carette J., Flynn R., Sarnow P. Loquacious modulates flaviviral RNA replication in mosquito cells. *PLoS Pathogens* 2022. 18(4): e1010163. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010163>
- Siqueira J., Oliveira D., Carvalho T., Portal T., Justino M., da Silva L., Resque H., Gabbay Y. Astrovirus infection in hospitalized children: molecular, clinical and epidemiological features. *Journal of Clinical Virology* 2017, 94: 79-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2017.07.014>
- Shichong H., Xiaojia W., Junyong G., Jinen W., Yun Z., Pinghua L., Zaixin L., Sahibzada A., Zihui Z., Ye J., Shiqi S., Huichen G. Nucleolin Promotes IRES-Driven Translation of Foot-and-Mouth Disease Virus by Supporting the Assembly of Translation Initiation Complexes. *Journal of Virology* 2021. Vol. 95, No. 13. <https://doi.org/10.1128/JVI.00238-21>
- Schmidt N., Lareau C., Keshishian H., Ganskih S., Schneider C., Hennig T., Melanson R., Werner S., Wei Y., Zimmer M., Ade J., Kirschner L., Zielinski S., Dölken L., Lander E., Caliskan N., Fischer U., Vogel J., Carr S., Bodem J., Munschauer M. The SARS-CoV-2 RNA-protein interactome in infected human cells. *Nature Microbiology* 2021. 6:339–353. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00846-z>
- Sigma-Aldrich. "Mammalian Expression Vectors for Transient Transfection and Expression" Consultado el día 05/05/2021 a las 01:00 en la dirección: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/cloning-and-expression/vector-systems/transient-expression.printerview.html>
- Snodgrass D., Angus K., Gray E., Menzies J., Paul G. Pathogenesis of Diarrhoea Caused by Astrovirus Infections in Lambs. *Archives of Virology* 1979. 60, 217–226. <https://doi.org/10.1007/BF01317493>
- Sztuba-Solińska J., Stollar V., Bujarski J. Subgenomic messenger RNAs: mastering regulation of (+)-strand RNA virus life cycle. *Virology* 2011. 412(2):245–55. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.02.007>
- Tajrishi M., Tuteja R., Tuteja N. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Communicative & Integrative Biology* 2011. 4(3). <https://doi.org/10.4161/cib.4.3.14884>
- Thermo-Fisher. "Protocolo 11668.2k.pps: Lipofectamine 2000". Fecha: 11/07/ 2006. Consultado el 09/06/2021 a las 17:21 en la dirección: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/protocols/cell-culture/transfection-protocol/lipofectamine-2000.html>

- Thermo-Fisher (2). "Chemiluminescent Western Blotting". Consultado el 13/06/2021 a las 21:20 en la dirección: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-western-blotting.html>
- Thivierge K., Nicaise V., Dufresne P., Cotton S., Laliberté J., Le Gall O., Fortin M: Plant Virus RNAs. Coordinated Recruitment of Conserved Host Functions by (+) ssRNA Viruses during Early Infection Events. *Plant Physiology* 2005. 138 (4): 1822-1827. <https://doi.org/10.1104/pp.105.064105>
- Tonello F., Massimino M., Peggion C. Nucleolin: a cell portal for viruses, bacteria, and toxins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2022. 79, 271. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04300-7>
- Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson Å., Kampf C., Sjöstedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szgyarto C., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J., Hober S., Alm T., Edqvist P., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J., Hamsten M., von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Pontén F. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015. 347(6220):1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research* 2021. 49, (D1-8), D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
- Varan G. y McClain W. The G x U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO reports* 2000. 1(1), 18–23. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd001>
- Viktorovskaya O., Greco T., Cristea I., Thompson S. Identification of RNA Binding Proteins Associated with Dengue Virus RNA in Infected Cells Reveals Temporally Distinct Host Factor Requirements. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2016. 10(8): e0004921. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004921>
- Verma R., Saha S., Kumar S., Mani S., Maiti T., Surjit M. RNA-protein interaction analysis of SARS-CoV-2 5'- and 3'-untranslated regions reveals a role of Lysosome-Associated Membrane Protein-2a during viral infection. *mSystems* 2021. 6: e00643-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00643-21>
- Waterhouse A., Procter J., Martin D., Clamp M., Barton G. Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 2009. 25 (9): 1189-1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Willcocks M., Boxall A., Carter M. Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins. *Journal of General Virology* 1999. 80(Pt 10):2607–11. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2607>

- Wohlgemuth N., Honce R., Schultz-Cherry S. Astrovirus Evolution and Emergence. *Infection, Genetics and Evolution* 2019. 69, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.009>
- Wong D. *The ABCs of Gene Cloning*. Tercera edición. 2018. Editorial Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-77982-9>
- Zhao Y., Wang J., Zeng C., Xiao Y. Evaluation of RNA secondary structure prediction for both base-pairing and topology. *Biophysics Reports* 2018. 4, 123–132. <https://doi.org/10.1007/s41048-018-0058-y>
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 2003. 31 (13): 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

Anexo

1.- Preparación de soluciones utilizadas en este trabajo

Soluciones para la técnica de Western Blot

- Buffer Laemmli 3X

Tris-HCl 50 mM, ajustado a pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%.

- Buffer Tris- glicina para electroforesis

100 mL de Tris-glicina 10X, 8 mL de SDS al 10%, cbp 1 L de agua desionizada.

- Solución CAPS para transferencia

100 mL de CAPS 10X, 100 mL de metanol grado reactivo, cbp 1 L de agua desionizada.

- Solución de azul de Coomassie para electroforesis

0.08% de azul brillante de Coomassie G250, 10% de ácido cítrico, 8% de sulfato de amonio, 20% metanol, 0.1% de ácido acético [v/v].

Soluciones para los ensayos de inmunoprecipitación de proteínas

- Buffer RIPA

Tris-HCl 50 mM a pH 7.5, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.005%, EDTA 1 mM y NaCl 150 mM

2.- Información adicional utilizada en este trabajo

Secuencias de las RNT de los astrovirus humanos

A continuación, se muestran en las tablas 1 y 2 las secuencias utilizadas para el análisis de composición de nucleótidos y estructuras.

Tabla A1.- Secuencias de astrovirus humanos utilizadas que contienen extremos UTR 5'.

Serotipo	Identificador GenBank	Serotipo	Identificador GenBank	Serotipo	Identificador GenBank	Serotipo	Identificador GenBank
HAstV-1	MK059949	HAstV-3	MK059951	HAstV-4	DQ070852	HAstV-8	AF260508
HAstV-1	L23513	HAstV-3	AF141381	HAstV-5	MK059953	HAstV-BF34	NC_024472
HAstV-1	Z25771	HAstV-3	MN444721	HAstV-5	JQ403108	HAstV-HMO-A	NC_013443
HAstV-1	NC_001943	HAstV-4	MK059952	HAstV-5	DQ028633	HAstV-MLB1	NC_011400

HAstV-1	KF211475	HAstV-4	AY720891	HAstV-5	MN433706	HAstV-MLB1	FJ222451
HAstV-1	HQ398856	HAstV-MLB2	NC_016155	HAstV-6	MK059954	HAstV-VA1	MT432184
HAstV-2	MK059950	HAstV-MLB3	JX857870	HAstV-6	HM237363	HAstV-VA2	GQ502193
HAstV-2	L13745	HAstV-SG	GQ891990	HAstV-6	GQ495608	HAstV-VA3	JX857868
HAstV-2	MN433705	HAstV-VA1	FJ973620	HAstV-7	MK059955	HAstV-VA4	JX857869
HAstV-2	KC285152	HAstV-VA1	NC_013060	HAstV-8	MK059956	Pune/063681/India	JF327666

Tabla A2.- Secuencias de astrovirus humanos utilizadas que contienen extremos UTR 3'.

Serotipo	Identificador GenBank	Serotipo	Identificador GenBank	Serotipo	Identificador GenBank	Serotipo	Identificador GenBank
HAstV-1	MK059949	HAstV-2	KC285152	HAstV-5	DQ028633	HAstV-HMO-B	GQ415661
HAstV-1	L23513	HAstV-3	MK059951	HAstV-5	MN433706	HAstV-MLB1	NC_011400
HAstV-1	Z25771	HAstV-3	AF141381	HAstV-6	MK059954	HAstV-MLB1	FJ222451
HAstV-1	NC_001943	HAstV-3	MN444721	HAstV-7	MK059955	HAstV-MLB2	NC_016155
HAstV-1	S47249	HAstV-4	MK059952	HAstV-7	Y08632	HAstV-MLB3	JX857870
HAstV-1	KF211475	HAstV-4	AY720891	HAstV-8	MK059956	HAstV-SG	GQ891990
HAstV-1	AY720892	HAstV-4	DQ344027	HAstV-8	AF260508	HAstV-VA1	FJ973620
HAstV-1	HQ398856	HAstV-4	DQ070852	HAstV-8	AF395738	HAstV-VA1	NC_013060
HAstV-2	MK059950	HAstV-5	MK059953	HAstV-BF34	NC_024472	HAstV-VA1	MT432184
HAstV-2	MN433705	HAstV-5	JQ403108	HAstV-HMO-A	NC_013443	HAstV-VA1	HM484374
HAstV-VA1	KY933670	HAstV-VA2	GQ502193	HAstV-VA3	JX857868	HAstV-VA4	JX857869

HAstV-VA5	KJ656124	Pune/063681/India	JF327666	HAstV-6	HM237363	VA1/HMO-C	KJ920197
HAstV-6	GQ495608	VA1/HMO-C	KJ920196	-	-	-	-

3.- Lista de proteínas identificadas en este trabajo

A continuación, se muestran en la tabla A4 las proteínas identificadas que están interactuando con las RNT 5' y 3' de los astrovirus clásicos y no clásicos. Se reportan de acuerdo con su código de identificación de Uniprot.

Tabla A3.- Lista de proteínas identificadas que están interactuando con las RNT 5' y 3' de los astrovirus clásico 8 y no clásico VA1.

	Astrovirus clásico 8, RNT 5'.	Astrovirus clásico 8, RNT 3'.	Astrovirus no clásico VA1, RNT 5'.	Astrovirus no clásico VA1, RNT 3'.
1	O75533	P26599	P22626	Q5VTL8
2	Q9H583	O75533	P07910	P17844
3	Q9H0A0	Q9H0A0	Q15365	Q8NAV1
4	Q9BUQ8	Q15365	Q99848	Q08170
5	Q5JTH9	Q9UQ80	Q6PK04	Q13247
6	Q14690	Q9BZI7	P12004	Q96GQ7
7	Q00341	P08621	Q9BYG3	P46087
8	Q9UJV9	P09651	P06748	Q15365
9	Q13573	P07910	P35232	P22626
10	Q9P2D1	Q9BY77	Q99623	Q06787
11	P07814	Q07955	P09651	P06748
12	Q01780	Q13838	Q9BRP8	Q15459
13	Q92615	Q96I25	P26599	O43290
14	Q9H307	Q15717	P07814	O75683
15	O76094	O15371	Q15717	P26368
16	C9J6P4	O75821	P52597	H7C2Q8
17	Q8TEQ6	P52597	Q9BY77	O75821
18	Q8N9T8	P22626	Q99729	A0A024R4E5
19	Q9HCE1	Q07666	P31942	O60812
20	Q6P2Q9	Q96I27	Q9HCE1	P07910
21	Q15393	Q13243	P31942	Q12906
22	O60231	P67809	Q9H307	Q15366-3
23	B5BUE6	Q9BYG3	P57721	Q99575

24	Q13243	A0A0B4J1V8	O60231	Q9Y388
25	Q9BQ39	P54577	Q9BUQ8	Q99575
26	Q8TDD1	Q01780	Q9UQ80	Q9Y388
27	O43592	Q14331	Q15029	P09651
28	O60812	O75494	Q9ULX6	P56182
29	A0A0S2Z491	Q13573	Q8TDD1	Q15020
30	Q5JQF8	Q06787	O43809	O95104
31	Q96PK6	P62995	P05198	Q13435
32	Q9P2N5	Q92900	Q01780	Q8WVK2
33	Q9UHB9	Q14444	P51991	P61011
34	Q15393	B5BUE6	P55795	Q13243
35	Q13243	Q6MZM2	Q99729-3	Q9Y5A9
36	Q96IZ7	Q99729	Q15366-3	O95218
37	P84103	P14866	Q86U06-5	Q01780
38	Q13242	A0A7I2V2R3	Q07666	Q99729-3
39	Q15365	Q99729-3	O75694	Q9BYG3
40	A0A0U1RRM4	P05455	Q9BRP8	Q9BRP8
41	Q92900	P06748	Q9UHX1	Q86U06-5
42	P14866	Q86U06-5	Q9H0A0	Q15287
43	Q13123	Q96IR1	J3KTL2	Q96IR1
44		P0DN76	O75533	P08621
45		O75494-3	Q12904	J3KTL2
46		A0A6Q8PFX2	Q6PI48	O75494-3
47		P31942	P55884	Q01130
48		Q13601	O15371	Q16629
49		Q9H307	O43592	P46013
50		Q9BRP8	A0A0B4J1V8	P50990
51		Q08J23	Q9H583	Q6PK04
52		O75940	Q13151	P35659
53		Q9Y5J1	Q12906	O00151
54		Q8WVK2	A0A804HJN6	P12273
55		P10155	Q13601	P05023
56		Q92667	Q71RC2	Q96CT7
57		A5PLM5	Q92615	A0A024R7V7
58		O43592	Q9H0S4	Q96AG4
59		A0A024R4E5	B5BUE6	Q13765
60		A0A804HJN6		P23246
61		A0A8I5KXC3		
62		A0A0S2Z491		
63		Q9UGY1		

