



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y  
HOMEOPATIA  
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACION  
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA  
MOLECULAR**



**DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE LA PROTEASA  
VIRAL 3CD DEL FCV DURANTE LA INFECCIÓN.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

:

Presenta

**M. en C. CANCIO LONCHES CLOTILDE**

**DIRECTORES DE TESIS:**

Dr. Juan Santiago Salas Benito

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano



México D.F. a 28 de Junio del 2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México siendo las 12 horas del día 6 del mes de Junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH

para examinar la tesis titulada:  
**DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE LA PROTEASA VIRAL 3CD DEL FCV DURANTE LA INFECCIÓN.**

Presentada por el alumno:

<b>Cancio</b>	<b>Lonches</b>	<b>Clotilde</b>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro: <b>B 0 7 1 6 8 4</b>

aspirante de:  
**DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Directores de tesis

Dr. Juan Santiago Salas Benito

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Dra. Mónica Ascención De Nova Ocampo

Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado

Dra. Rosa María del Angel Núñez de Cáceres

  
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES  
SECRETARÍA DE  
EDUCACION PUBLICA  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA  
Y HOMEOPATÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
INVESTIGACION

Dr. César Augusto Sandino Reyes López



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México D.F. el día 10 del mes Junio del año 2011, el (la) que suscribe Clotilde Cancio Lonches alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biomedicina Molecular con número de registro B071684, adscrito a la Sección de Estudios de Posgrado de Investigación-ENMyH, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de el Dr. Juan Santiago Salas Benito y la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y cede los derechos del trabajo intitulado "Distribución Intracelular de la proteasa Viral 3CD del FCV durante la Infección", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección alonso@cinvestav.mx y jsalasb@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M. en C. Clotilde Cancio Lonches  
Nombre y firma

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 9 DE  
VIROLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE INFECTOMICA Y  
PATOGENESIS MOLECULAR DEL CINVESTAV ZACATENCO-IPN**

## **AGRADECIMIENTOS:**

Este trabajo fue financiado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de proyecto 43788-Q y del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal con número de proyecto ICYTDF/247.

Durante la realización de este trabajo la estudiante Clotilde Cancio Lonches fue apoyada como becaria del PIFI y por el apoyo de la Beca Institucional del IPN.

A mis padres por todo el apoyo incondicional que siempre me han dado.

A mi esposo por estar siempre a mi lado.

Muy en especial a la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano por haber tenido confianza en mí, por haberme ayudado durante mi formación académica, por haberme tenido tanta paciencia durante sus enseñanzas, por haber compartido su tiempo conmigo y por ser mi amiga.

A José Luis Chavarría Islas y Clara Castelán Domínguez por su apoyo técnico.

Al Auxiliar de Investigación Jaime Escobar Herrera por su apoyo técnico y material biológico proporcionado.

Al Auxiliar de Investigación Fernando José Medina Ramírez por su asistencia incondicional con los cultivos celulares y por estar siempre fastidiándome.

## **DEDICADO:**

A mis padres Guadalupe y Arturo

A mi hija Miriam

*Como la brisa que genera el galope de un unicornio y como la lágrima de un fénix que nos acaricia solo en sueños, así es la vida, solo un momento en el cual nos enseña que siempre hay que estar de pie ante todo lo incomprensible y la adversidad..... sin arrepentimientos.*

*La vida es una pequeña gota de estrella fugaz, es como sentir el paso del tiempo sin poderlo detener, así son los conocimientos que vamos adquiriendo día a día.*

# **COMITÉ TUTORIAL**

## **DIRECTORES DE TESIS**

Dr. Juan Santiago Salas Benito

PIBIOM, ENMH, IPN

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

CINVESTAV-IPN

DEPARTAMENTO DE INFECTOMICA Y PATOGENESIS MOLECULAR

## **ASESORES**

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

CINVESTAV-IPN

DEPARTAMENTO DE INFECTOMICA Y PATOGENESIS MOLECULAR

Dra. Mónica Ascensión De Nova Ocampo

PIBIOM, ENMH, IPN

Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado

PIBIOM, ENMH, IPN

# **ÍNDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	14
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	18
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	19
<b>RESUMEN</b>	21
<b>ABSTRACT</b>	24
<b>INTRODUCCIÓN</b>	27
Clasificación	27
Transmisión y Sintomatología	28
Características generales de los Calicivirus	30
<b>PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DE LOS NV</b>	31
P48 (p37) o NS1/2	31
P41 (p40) NTPase o 2C Like o NS3	31
P22 (p30) o NS4	32
VPg o NS5	32



3CL <sup>pro</sup> o NS6	33
RdRp o 3D NS7	33
<b>PROTEÍNAS ESTRUCTURALES</b>	33
VP1	33
VP2	34
Características y Organización Genómica del FCV	35
Ciclo Replicativo	35
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	40
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	40
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	40
<b>METODOLOGÍA</b>	41
Diseño de dos péptidos inmunogenicos presentes en la región de la Replicasa 3D del FCV	41
Inmunización de Ratones	41
Inmunización de Conejos	42
Propagación y mantenimiento de células CrFK	43

Infección y Propagación del FCV	43
Cuantificación del FCV mediante ensayos de plaqueo	44
Inactivación del FCV con UV	45
Extractos Totales (RSB-NP40)	45
Extractos Citoplásmicos	46
Extractos Nucleares	46
Ensayos tipo Western Blot	47
Inmunofluorescencia para la localización de proteínas virales	49
Reversa transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	50
Obtención del RNA en células CrFK infectadas por el método de TRIZOL	50
Amplificación por PCR del gen que codifica para la proteasa polimerasa 3D o NS7	51
Clonación del gene de la proteasa polimerasa en el vector TOPO TA	52
Preparación de células competentes	52

Transformación de células competentes	53
Obtención del ADN plasmidico	54
Construcción del plásmido de expresión 4EGFP-3CD	55
Purificación de ADN por Electroelución	56
Desfosforilación de los fragmentos de ADN plasmidico	56
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	57
Reacción de Ligación	57
Transfección de células por el método de lipofectamina utilizando p4EGFPSV40, p4EGFP y 4GFP3CD	58
Transfección de células CrFK utilizando pEGFP y GFP3CD o NS6/NS7 por el método de electroporación.	59
Aislamiento de Complejos Replicativos a partir de células CrFK	59
Extractos Totales con Buffer TN	60
Ensayos de interferencia del gen de la proteína Nucleolina	61
Diseño y Síntesis de siRNAs	61
Ensayos de transfección de los siRNAs contra el RNAm de la Nucleolina en células CrFK	62

<b>RESULTADOS</b>	63
Evaluación de los anticuerpos anti- 3CD o NS6/NS7, generados en ratones y conejos inmunizados	63
Establecimiento de la infección del FCV en células CrFK	66
Detección de proteínas virales del FCV por RT-PCR y ensayos de Inmunofluorescencia	67
Detección de la proteína 3CD o NS6/NS7 a diferentes tiempos de infección con el FCV	70
Análisis de la presencia de la proteasa polimerasa (3CD o NS6/NS7) en células infectadas por Inmunofluorescencia.	75
Determinación de una posible secuencia de localización nuclear en la proteína 3CD o NS6/NS7 de Feline Calicivirus	83
Clonación de la 3CD o NS6/NS7 en el vector de expresión 4EGFP	84
Subclonación del gen de la 3CD o NS6/NS7 en el vector de expresión 4EGFP	85
Expresión de la proteína 3CD o NS6/NS7 en células CrFK transfectadas con el plásmido 4GFP3CD	87

Ensayo de Inmunofluorescencia para analizar si la 3CD o NS6/NS7 interacciona con Nucleolina	91
Ensayo de Inmunofluorescencia con el virus inactivado en células CrFK	94
Ensayo de Co-localización de Nucleolina con la 3CD o NS6/NS7 en ensayos de Inmunofluorescencia en células CrFK	95
Ensayos de silenciamiento de la expresión de la proteína Nucleolina sobre células CrFK transfectadas	98
<b>DISCUSIÓN</b>	106
<b>RESUMEN DE RESULTADOS</b>	113
<b>CONCLUSIONES</b>	114
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	115
<b>ARTICULO ACEPTADO</b>	124

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Esquema 1.</b> Organización Genómica de los Calicivirus	Pag. 30
<b>Figura 1.</b> Modelado de la región carboxilo terminal de la proteína NS6/NS7 (3CD) de FCV.	Pag. 64
<b>Figura 2.</b> Detección de la proteína r3CD o NS6/NS7 con los anticuerpos policlonales anti-3CD o NS6/NS7 por Western Blot.	Pag. 65
<b>Figura 3.</b> Microscopia por contraste de fase de células CrFK infectadas con FCV.	Pag. 66
<b>Figura 4.</b> Reacción de RT-PCR a partir de células no infectadas.	Pag. 67
<b>Figura 5.</b> Detección de la proteína viral VpG de FCV en células CrFK infectadas por ensayos de Inmunofluorescencia.	Pag. 68
<b>Figura 6.</b> Titulación viral mediante el método de plaqueo con Carboximetilcelulosa.	Pag. 69
<b>Figura 7.</b> Detección de la proteína 3CD o NS6/NS7 en extractos citoplásmicos y nucleares de células CrFK infectadas por ensayos de WB.	Pag. 71
<b>Figura 8.</b> Detección de la proteína 3CD o NS6/NS7 en citoplasma de CrFK infectadas por ensayos de WB.	Pag. 73

<b>Figura 9.</b> Detección subcelular de la proteína 3CD o NS6/NS7 en células infectadas con FCV por inmunofluorescencia.	Pag. 76
<b>Figura 10.</b> Detección de la proteína 3CD o NS6/NS7 en células CrFK infectadas por ensayos de Inmunofluorescencia.	Pag. 78
<b>Figura 11.</b> Localización subcelular de la proteína viral 3CD o NS6/NS7 a diferentes tiempos post-infección.	Pag. 80
<b>Figura 12.</b> Colocalización de la proteína 3CD o NS6/NS7 con DAPI.	Pag. 82
<b>Figura 13.</b> Alineamiento de la secuencia de la proteasa polimerasa 3CD o NS6/NS7 de FCV con otros miembros de la familia.	Pag. 83
<b>Figura 14.</b> Amplificación del gen de la 3CD o NS6/NS7 por RT-PCR.	Pag. 84
<b>Figura 15.</b> Análisis de las colonias transformadas con el producto de la ligación del gen 3CD o NS6/NS7 en el vector pCRII TOPO por PCR.	Pag. 85
<b>Figura 16.</b> Análisis de la colonia con el producto del gen 3CD o NS6/NS7 en el vector 4EGFP.	Pag. 86
<b>Figura 17.</b> Análisis de la colonia candidata para determinar su orientación.	Pag. 87

<b>Figura 18.</b> Localización subcelular de las proteínas 4EGFP, 4EGFP-NLS y 4EGFP-3CD o NS6/NS7 en células no infectadas e infectadas con FCV.	Pag. 89
<b>Figura 19.</b> Cinética del virus inactivado por luz Ultravioleta (UV).	Pag. 92
<b>Figura 20.</b> Ensayo de plaqueo en células CrFK con el virus inactivado por luz UV de 45 minutos y tinción con cristal violeta.	Pag. 93
<b>Figura 21.</b> Ensayo de inmunofluorescencia con el virus inactivado en células CrFK.	Pag. 95
<b>Figura 22.</b> Colocalización de nucleolina y 3CD o NS6/NS7o NS6/NS7durante la infección por FCV.	Pag. 97
<b>Figura 23.</b> Presencia de la proteína nucleolina en Complejos replicativos (CR).	Pag. 98
<b>Figura 24.</b> Evaluación del silenciamiento de la nucleolina en células CrFK por WB.	Pag. 99
<b>Figura 25.</b> Porcentaje de viabilidad de células CrFK transfectadas con siRNAs de nucleolina.	Pag. 101
<b>Figura 26.</b> Efecto del silenciamiento de nucleolina y siRNA no relacionado utilizando células CrFK.	Pag. 102



**Figura 27.** Efecto de la expresión de la proteína Viral 3CD de FCV tras el silenciamiento de nucleolina.

Pag. 103

**Figura 28.** La replicación del FCV es inhibida por el siRNA de Nucleolina.

Pag.105

## **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Esquema de inmunización de cada péptido con los diferentes grupos de ratones.	Pag. 42
<b>Tabla 2.</b> Esquema de inmunización de cada péptido en cada grupo de Conejos.	Pag. 43
<b>Tabla 3.</b> Relación de anticuerpos y diluciones.	Pag.48
<b>Tabla 4.</b> Relación de anticuerpos y diluciones para Inmunofluorescencias.	Pag.50

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>FCV</b>	Felin Calicivirus
<b>MNV</b>	Norivirus Murino
<b>NoV</b>	Norovirus
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>siRNA</b>	Ácido ribonucleico interferente
<b>KDa</b>	Kilodaltones
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>MOI</b>	Multiplicidad de Infección
<b>HuCVs</b>	Calicivius Humanos
<b>RNT</b>	Región no traducida
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>RT-PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplado a la Transcripción reversa
<b>PV</b>	Polio Virus
<b>NLS</b>	Secuencia de Localización Nuclear
<b>CrFK</b>	Células epiteliales de Riñón de Gato
<b>UV</b>	Luz Ultravioleta
<b>WB</b>	Western Blot

<b>MTM</b>	Marcador de Tamaño Molecular
<b>NI</b>	No Infechadas
<b>INF</b>	Infechadas
<b>CR</b>	Complejos Replicativos
<b>nM</b>	Nano Molar
<b>dsRNA</b>	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia

## RESUMEN

La gastroenteritis aguda es un problema de salud importante con un alto impacto en morbilidad y mortalidad a nivel mundial y es causada por diversos patógenos, entre los que se encuentran los virus. Entre ellos, los miembros de la familia *Caliciviridae*, causantes de una gran variedad de enfermedades en animales, son considerados como la causa más importante de brotes de gastroenteritis en la población humana a nivel mundial. Estos virus fueron los primeros en haber sido identificados como causantes de gastroenteritis, sin embargo el estudio de su biología se ha retrasado porque no pueden propagarse en cultivos celulares.

El uso de modelos animales, como el calicivirus felino (FCV), para el estudio de los que infectan humanos, ha sido un recurso que ha permitido el conocer aspectos importantes de la biología y la patogénesis de estos virus. Los calicivirus son esféricos, con un genoma de RNA de cadena sencilla y de polaridad positiva, que llevan a cabo su replicación en el citoplasma de células infectadas, y se liberan mediante lisis celular. La infección celular por virus líticos, resulta en una interacción extensiva entre las proteínas y los genomas virales, y las vías macromoleculares de las células hospederas, lo que trae como consecuencia la replicación viral exitosa y la muerte de las células infectadas. Aunque los calicivirus llevan a cabo su replicación en el citoplasma celular, estos, como muchos otros virus de RNA, dependen de moléculas presentes en diferentes compartimentos celulares como el núcleo. La accesibilidad a los componentes compartimentalizados depende de ciertas estrategias que los virus han desarrollado, como lo con la internalización de

componentes virales en ellos, o la relocalización de ciertos factores celulares hacia los sitios en donde se lleva a cabo la replicación viral.

La proteasa polimerasa 3CD o NS6/NS7 del FCV, encargada del procesamiento de la poliproteína no estructural y de la replicación de las moléculas de RNA, lleva a cabo su actividad en el citoplasma de las células infectadas. Sin embargo en este trabajo hemos determinado que esta proteína viral se encuentra presente en regiones perinucleares y en cierta proporción en el interior del núcleo celular. Por ensayos *in silico*, se determinó que esta proteína contiene en el extremo carboxilo terminal, una secuencia de localización nuclear bipartita, conservada entre diferentes miembros de familia *Caliciviridae*. La expresión transitoria de una proteína de fusión 4EGFP-3CD del FCV, en las células CRFK mostró que esta proteína tiene una localización citoplasmática, sin embargo, cuando las células fueron super-infectadas con el FCV, esta proteína mostró cierta localización nuclear.

Por otra parte, antecedentes en el laboratorio habían demostrado la interacción de la proteína nucleolina, una proteína multifuncional de localización nucleolar, con la región no traducida 3' del genoma del FCV. Dado que este es el sitio en donde interaccionan el RNA y la proteasa-polimerasa 3CD, para comenzar la síntesis de RNA de polaridad negativa, decidimos investigar la posible participación de la nucleolina en este proceso. Inicialmente determinamos que la nucleolina se relocaliza de los nucléolos al nucleoplasma tras la infección con el FCV, y que interacciona con la proteasa-polimerasa 3CD en la periferia del núcleo. Más aún, para determinar si esta proteína participaba en la replicación viral, se realizaron ensayos de inhibición de la expresión de la proteína nucleolina mediante ensayos con RNAs interferentes. En

estos ensayos se observó que la inhibición de la expresión de la proteína nucleolina traía como consecuencia una reducción significativa de las proteínas virales no estructurales y en la producción de partículas virales; indicando que la nucleolina interacciona con la proteasa polimerasa 3CD del FCV y que ambas moléculas participan en la replicación del FCV, confirmando un papel funcional de la nucleolina en el ciclo de vida del FCV.

## **ABSTRACT**

Acute gastroenteritis is an important health problem with high mobility and mortality rates in the entire world. It is caused by several pathogens, such as viruses. Among them, the members of the *Caliciviridae* family, that cause a variety of diseases in animals, are considered the most important cause of outbreaks of viral gastroenteritis in humans, worldwide. These viruses were the first ones identified as responsible for causing gastroenteritis, however, the study of their biology has been delayed because they can not propagate in cell cultures.

The use of animal models like the feline caliciviruses (FCV) to understand the biology of the ones that infect humans, has allowed to better understanding its biology and pathogenesis. Caliciviruses are spherical with a single stranded and positive polarity RNA as a genome; that replicate in the cytoplasm of the infected cells and are released by cell lysis. Infection by lytic viruses result in an extensive interaction among viral proteins and genomes with host cell macromolecular pathways, which results in a successful viral replication and cell death. Although caliciviruses replicates in the cell cytoplasm, they depend of molecules located in different cell compartments such as the nucleus, like other RNA viruses. The accessibility to some of the compartmentalized components depend on certain strategies that some viruses have developed, such as some strategies to get some viral components into these compartments or the relocation to certain cell factors to places where viral replication takes place.



The FCV polymerase protease 3CD or NS6/7 is responsible for the non structural polyprotein processing and RNA replication in the cytoplasm of the host cell. However, we have determined that this viral protein is localized in the perinuclear regions and in certain level in certain proportion in the nucleus of the infected cells. By *in silico* analysis, it was determined that this protein contains a putative bipartite nuclear localization signal in the carboxy terminal region, conserved in several members of the *Caliciviridae* family. The transitory expression of a fusion protein: 4EGFP-3CD from FCV into CRFK cells has shown that this protein is expressed in the cytoplasm, however, when cells were super infected with the FCV, this protein showed a nuclear localization in come extent.

On the other hand, some evidences generated in our laboratory had demonstrated the interaction of the nucleolin, a multifunctional protein with nucleolar localization, and the 3' UTR of the FCV genomic RNA. Because this is the place where the protease-polymerase 3CD protein binds to the RNA to start the negative polarity RNA synthesis, we decide to investigate if nucleolin could participate in this process. Initially, we determined that nucleolin is relocated from the nucleolus to the nucleoplasm as a consequence or FCV infection, and that both nucleolin and the protease polymerase 3CD interact in the perinuclear region.

Furthermore, to determine if nucleolin participates in FCV replication, we performed an siRNA assays to inhibit the expression of a nucleolin. In this assays we have observed that this inhibition resulted in a significant reduction of the non-structural proteins and also a reduction in the viral particle production. Thus, this results indicate

that nucleolin interact with FCV 3CD and that this molecule participates in the FCV replication, confirming the functional role of nucleoline in the FCV life cycle.

# **DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE LA PROTEASA VIRAL 3CD DEL FCV DURANTE LA INFECCIÓN**

## **INTRODUCCIÓN**

La gastroenteritis es una enfermedad común en el humano; está estimado que en todo el mundo existen más de 700 millones de casos, de los cuales entre 3.5 y 5 millones son causa de mortalidad anual en países en vías de desarrollo.

La gastroenteritis aguda es causada por una variedad de diferentes patógenos incluyendo bacterias, parásitos y virus. Entre estos últimos podemos encontrar a los rotavirus, astrovirus, adenovirus y calicivirus,

Específicamente los calicivirus que infectan a los humanos (HuCVS) fueron los primeros en haber sido identificados como causantes de este tipo de cuadros y hoy en día son considerados como la causa más importante de brotes de gastroenteritis y también son una causa significativa de casos esporádicos de diarrea tanto en niños como en adultos (Glass, 2009).

## **CLASIFICACIÓN**

La familia *Caliciviridae* está formada por virus que infectan a un amplio rango de huéspedes humanos y animales y causan una variedad de enfermedades y desordenes, tales como gastroenteritis, lesiones vesiculares, infecciones respiratorias, problemas reproductivos y enfermedades hemorrágicas (Clarke, 1997). Está formada

por 5 géneros: *Norovirus* y *Sapovirus*, que incluyen a los que infectan a humanos, y cuyo prototipo es el virus Norwalk, y *Becovirus*, *Lagovirus*, y *Versivirus*. Estos dos últimos incluyen a los virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) y al calicivirus felino (FCV) como prototipos de cada género respectivamente (Mayo, 2002).

Los calicivirus que infectan a humanos (HuCVs) y causan lo que comúnmente se conoce como gastroenteritis viral aguda, no bacteriana ó infección por el calicivirus. El género *Norovirus* se encuentra constituido por 5 genogrupos: en el I, II y IV se agrupan los virus de humano en el III DEC (puerco) y en el V el del ratón o MNV.

## **TRANSMISIÓN Y SINTOMATOLOGÍA**

Los NoVs son cosmopolitas, muy infecciosos y soportan condiciones ambientales adversas. Estos virus se transmiten por la ruta fecal-oral, a través de consumo de alimentos o agua contaminada y se propagan por el contacto entre personas o con superficies contaminadas. La mayoría de los brotes de gastroenteritis ocurren en lugares semi cerrados como: restaurantes, hospitales, escuelas, aviones y en cruceros principalmente; los brotes en estos últimos son en los que se han reportado más frecuentemente.

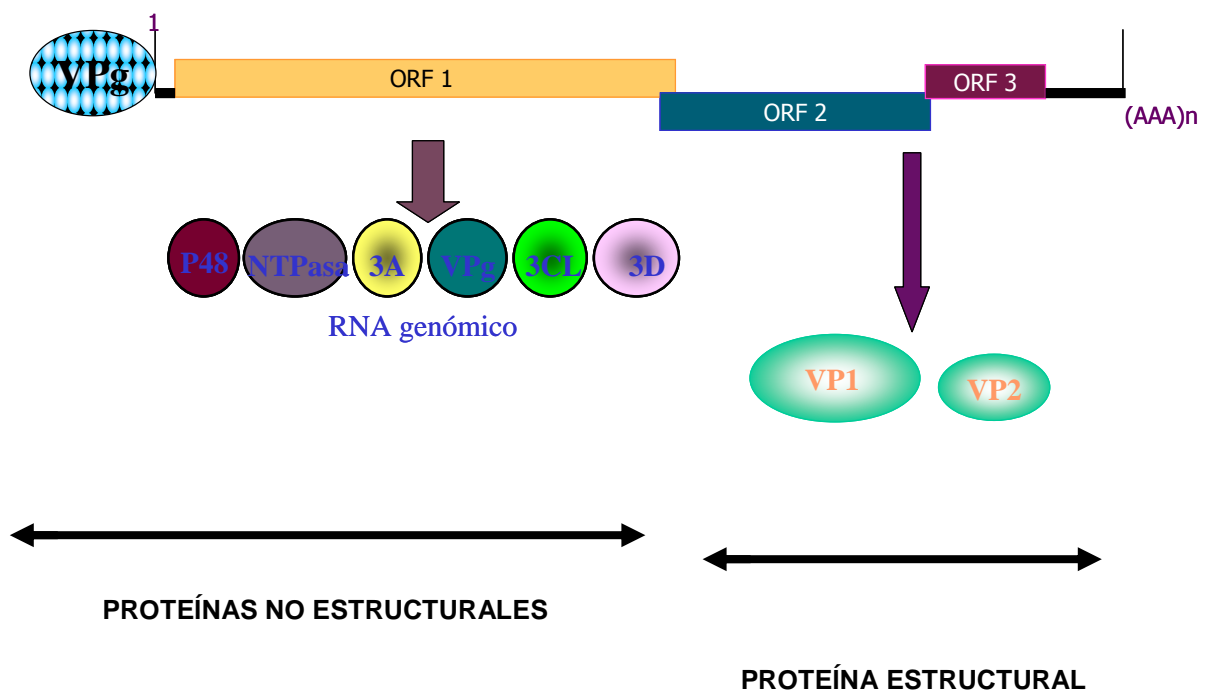
Por lo general, la enfermedad causada por los HuCVs no es grave, aunque las personas pueden presentar síntomas como diarrea, vómito y dolores abdominales que producen un malestar severo durante casi todo el día. También se presenta fiebre de bajo grado (38.3 y 38.8 °C), escalofríos, dolor de cabeza, dolor muscular y

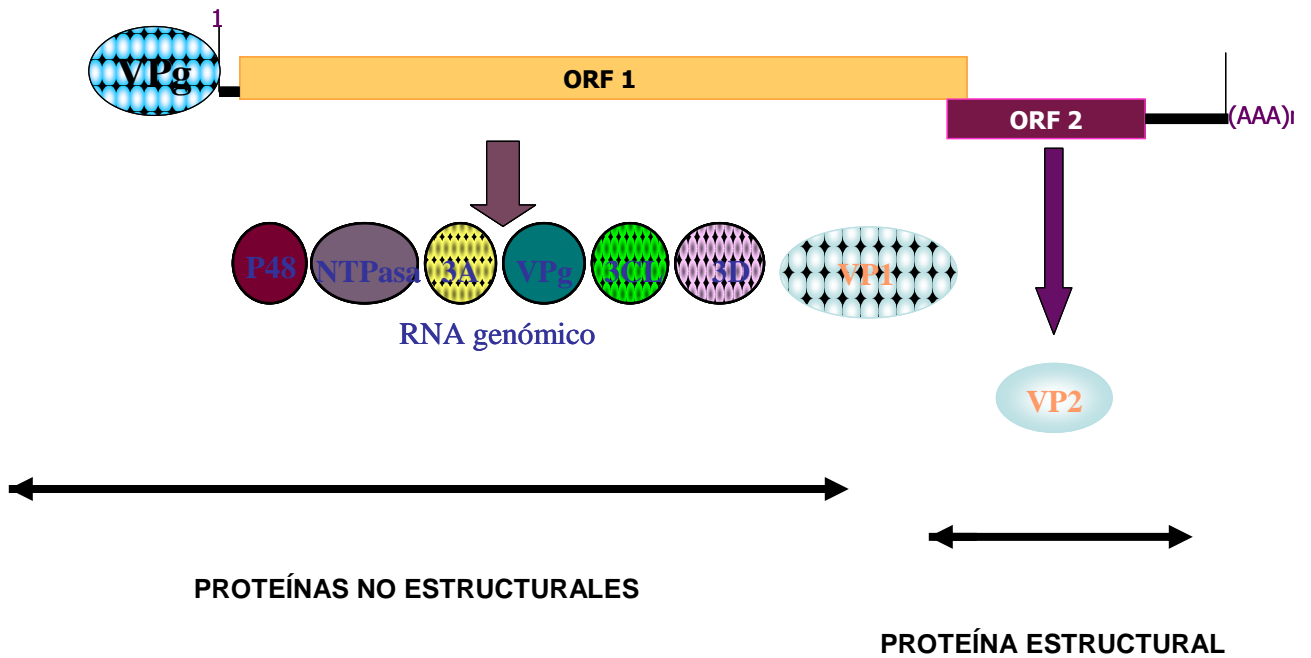
una sensación general de cansancio. La enfermedad se presenta a menudo en forma repentina y las personas infectadas pueden llegar a sentirse muy mal. Usualmente, la enfermedad es breve, y los síntomas perduran solo 1 o 2 días. El síntoma más grave es la deshidratación debido a la falta de un adecuado reemplazo de líquidos que se pierden debido al vómito y a la diarrea, lo cual si no se controla adecuadamente puede requerir atención médica especial. Aunque las gastroenteritis por norovirus son en general moderadas y de corta duración, evidencias recientes sugieren que esta infección puede ser severa y en ocasiones fatal, especialmente entre las poblaciones susceptibles como adultos mayores y niños pequeños. En algunas poblaciones asiáticas la infección por NoVs se ha asociado con complicaciones mas severas, como enterocolitis necrotizante y ataques de epilepsia benigna en neonatos (Turcios-Ruiz y cols. 2008; Chen y cols. 2009). Las estrategias para el control de la transmisión de los HuCVs así como el desarrollo de una vacuna viable son muy limitadas, principalmente porque no se dispone de un sistema de propagación para el estudio su replicación. Por su alta infectividad, extrema estabilidad, resistencia a los desinfectantes comunes y capacidad para causar enfermedad incapacitante, los NoV se han clasificado como agentes biológicos categoría B.

Cualquier persona puede infectarse con los calicivirus humanos y el desarrollo de la inmunidad es de corto plazo, por lo que la enfermedad puede repetirse en severas ocasiones durante el transcurso de la vida de una persona. Además, debido a las diferencias entre los factores genéticos, algunos pacientes pueden presentar una infección asintomática, mientras que otras son más susceptibles de infectarse y contraer una enfermedad sintomática o más grave.

## CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CALICIVIRUS

Los calicivirus son partículas esféricas no envueltas de 25 o 35 nm de diámetro con un genoma de RNA lineal de cadena sencilla y de polaridad positiva, de 7.3 a 8.3 Kb de longitud y poliadenilado. En general pueden poseer 2 o 3 marcos de lectura abierto (ORF's). El primero codifica a las proteínas no estructurales, que participan en el ciclo replicativo pero que no forman parte del virión. Los ORF's 2 y 3 codifican para las proteínas estructurales o de la cápside (Esquema 1) (Clarke, 2000). El genoma posee en el extremo 5' una región no traducida de 5 nucleótidos y en el primero se encuentra unida covalentemente a una proteína viral o VPg. En el extremo 3' posee una región no traducida (RNT) de 66 nucleótidos seguida de la cola de poli A que forma una estructura de orquilla (Clarke, 2000).





### B) SAPOVIRUS Y LAGOVIRUS

Esquema 1. Organización Genómica de los Calicivirus A) Los géneros *Norovirus* y *Vesivirus* tienen 3 ORF. B) Los géneros *Sapovirus* y *Lagovirus* tienen dos ORF.

## PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DE NV

### P48 (p37) o NS1/2

La proteína N-terminal tiene una función desconocida hasta ahora (Sadowy 2001).

### P41 (p40) NTPasa o 2C Like o NS3

La proteína p41 o 2C like es una NTPasa semejante a la helicasa 2C de los Picornavirus (Mitra 2004). Esta proteína hidroliza a todos los nucleótidos, sin embargo a diferencia de la 2C de los picornavirus no tiene actividad de helicasa.

### **P22 (p30) o NS4**

P22 ocupa una posición en el genoma de norovirus similar a la posición de la proteína 3A en el genoma de los picornavirus. No se conoce la función exacta de p22 a excepción de que se encuentra presente en el precursor p22-VPg-3CL<sup>pro</sup> (Belliot 2003).

### **VPg o NS5**

La VPg es de aproximadamente 15 kDa y está covalentemente unida al primer nucleótido a los RNAs geonómicos y subgenómicos, virales tanto de los calicivirus como de otras familias de virus como: *Picornaviridae*, *Potyviridae*, *Luteoviridae* y *Comorividae* (Burroughs 1978 y Sadowy 2001).

La VPg se ha asociado con la traducción del RNA viral y aunque no se ha descrito el mecanismo, el RNA no se traduce en su ausencia. Esto se basa en los experimentos de traducción *in vitro* realizados por Sosnovtsev y colaboradores en los que se encontró que al retirar a la VPg del RNA geonómico del FCV, se reducían los niveles de síntesis de la proteína viral, sin embargo si ésta es sustituida por una cap, el RNA viral puede traducirse. Debido a esto se ha propuesto que la VPg podría funcionar en el reclutamiento del ribosoma para que el RNA viral se traduzca (Sosnovtsev, 2000). Adicionalmente la asociación de VPg con algunos factores del inicio de la traducción apoyan la hipótesis de que esta proteína está implicada en la traducción viral (Clarke, 2000).



### **3CL<sup>pro</sup> o NS6**

La única Proteasa codificada por los Calicivirus es la llamada 3C-Like (3CL<sup>pro</sup>), porque es similar a la 3C de los *Picornavirus*. En el caso de los *vesivirus*, como el FCV, la 3C se encuentra en forma de precursor 3CD y no se autoprocresa, mientras que en los *Norovirus* esta se autoprocresa dando origen a la proteasa 3C y a la replicasa 3D.

### **RdRp o 3D NS7**

La 3D o replicasa viral (RdRp) de los *Calicivirus* tiene la función de replicasa de RNA dependiente de RNA. En general puede presentarse como una proteína bifuncional precursora 3CD o NS6/NS7, como en el FCV, o autoprocresarse como en los *Norovirus*, dando origen a dos proteínas 3C y la 3D.

## **PROTEÍNAS ESTRUCTURALES**

Las proteínas estructurales están codificadas a partir de un RNA subgenómico.

### **VP1**

VP1 es la proteína mayoritaria de la cápside, con un peso molecular de 58 a 60 KDa; posee dos dominios conservados que funcionan como determinantes antigénicos específicos para la cadena ligera de las inmunoglobulinas.

El virión se encuentra formado por 180 copias de VP1; su simetría es icosaédrica y posee un pliegue con dos dominios grandes: uno designado como S de cubierta y otra P de protuberancia. El dominio P está dividido en dos subdominios que contienen

a P1 y P2. El dominio P2 es de 127 aminoácidos (se encuentra localizado en los aminoácidos de 279 al 405 en el genoma de Norwalk). El dominio P1 se encuentra localizado en la superficie distal del plegamiento del monómero. La hipervariabilidad del dominio P2 juega un papel importante como receptor de unión y en la respuesta inmune (Pfister 2001 y Sosnovtsev 1995).

## **VP2**

VP2 es la proteína básica minoritaria de la cápside con un peso molecular entre 22 y 29 KDa cuyas características fisicoquímicas hacen pensar que puede asociarse con el genoma viral, sin embargo, su papel de VP2 en la replicación no se conoce aún, pero se sabe que cada virión puede presentar entre una y dos copias (Vázquez 1998 y Prasad 1994).

A pesar de algunas diferencias que se presentan entre la organización genómica y el procesamiento de las proteínas de los miembros de esta familia, se ha asumido que los mecanismos generales de replicación deben ser semejantes. Dado que los calicivirus que infectan humanos (HuCVs) no son cultivables, las investigaciones que se han realizado en estudios *in vitro* con los *Norovirus*, han utilizado al FCV como el modelo funcional de la replicación de este grupo de virus, dado que este si es cultivable.

## **CARACTERÍSTICAS Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL FCV**

El FCV, pertenece al género *Vesivirus* y es el principal agente de enfermedades respiratorias en gatos. Su genoma, de aproximadamente 7.7 Kb, está organizado en 3 ORF, al igual que los *Norovirus*. El primer marco de lectura codifica para una poliproteína de 200 KDa que es procesada por la 3C-Like, al igual que en los *Norovirus*, sin embargo el precursor no posee sitio de procesamiento por lo que siempre se encuentra como propeptido 3CD o NS6/NS7, a diferencia de los *Norovirus* es que la 3CD o NS6/NS7 es la forma mayoritaria en célula transfectadas, aunque también se detectan a los péptidos 3C o NS6 y 3D o NS7 por separado. El segundo y tercer marco de lectura también codifica para VP1 y VP2 respectivamente (Carter 1992, Herbert 1997 y Neill 1991).

## **CICLO REPLICATIVO**

Dado que el FCV es uno de los *Calicivirus* cultivables, y que su organización genómica es muy semejante a los *Norovirus*, este ha sido extensamente estudiado para conocer las estrategias replicativas de estos virus de importancia para el humano.

La infección del FCV inicia con la unión del virión al un receptor de la superficie celular, identificado como JAM 1 (Akiko Makino, 2006), seguida de la penetración a la membrana de la célula, por la vía de endocitosis dependiente de clatrina (Stuart 2006).

Posteriormente el genoma del virus es liberado en el citoplasma en donde ocurre la síntesis de una poliproteína que se autoprocesa mediante la actividad de la proteasa o 3CD y dar origen a las proteínas no estructurales.

Estas proteínas, aunque no forman parte del virión como tal, participan activamente en la replicación del RNA viral. A partir del RNA genómico, se copian moléculas de RNA de polaridad negativa las cuales son utilizadas para: 1) la formación de RNAs de cadena positiva que principalmente forman el genoma de la progenie viral, y 2) la síntesis de RNAs subgenómicos a partir de los cuales se sintetizan las proteínas estructurales.

Tanto la síntesis de las proteínas, como del RNA virales, depende de la maquinaria celular, es decir de las proteínas celulares, las cuales tienen una participación activamente en estos procesos. De igual manera, las proteínas virales, además de participar en la replicación viral, actúan inhibiendo procesos celulares para promover que el virus logre multiplicarse.

Una de las moléculas que participan más eficientemente en el establecimiento de la infección viral son las proteasas virales que son enzimas catalíticas que hidrolizan en un sitio específico y se clasifican dependiendo del sitio de acción en exoproteasas y endoproteasas. Las exoproteasas remueven a los aminoácidos de los extremos amino o carboxilo terminal de las proteínas mientras que las endoproteasas actúan entre dos aminoácidos internos. La 3CD o NS6/NS7 de los *Calicivirus* es una serina proteasa, y poseen una triada catalítica de Histidina (His), Asparagina (Asp) y Serina (Ser).

Las proteasas son indispensables para el establecimiento de la infección viral ya que además de procesar a las proteínas virales para que el ciclo replicativo se lleve a cabo correctamente, también modifican algunos procesos celulares. Por ejemplo, en Poliovirus, la proteasa 3C procesa a algunos factores de transcripción, y a algunos factores implicados en el inicio de la traducción celular como el eIF4G, lo que trae como consecuencia un abatimiento general de la traducción de proteínas celulares y permitiendo al virus aprovechar la maquinaria traduccional celular sin que exista competencia. En este mismo sentido, se conoce que algunos *Calicivirus* procesan también a el factor eIF4G y a la proteína PABP con este mismo fin (Bienz, 1994). Por otra parte la regulación de la replicación de este tipo de virus requiere de la participación de factores celulares que están compartimentalizados en organelos como el núcleo, y que deben estar accesibles para interactuar con el RNA viral. Es bien sabido que las proteasas virales inducen el procesamiento de algunas de las proteínas involucradas en el transporte de moléculas del núcleo al citoplasma. Como consecuencia de ello ocurre una falla en el transporte de proteínas, y por lo tanto una severa modificación de algunas funciones celulares; sin embargo la relocalización de proteínas nucleares hacia el citoplasma favorece la replicación de la partícula viral. Un ejemplo de ello es la re-localización de la proteína La del núcleo al citoplasma durante la infección por PV. Esta proteína de 52 kDa, también llamada SS-B cuya función celular ocurre durante la iniciación y terminación de la transcripción dependiente de RNA polimerasa III, es también indispensable para la traducción de este virus. Tras la infección, la proteasa 3C procesa a La y la separa de su secuencia de localización nuclear (NLS), lo que permite la relocalización del péptido mayor

(48kDa) hacia el citoplasma, aumentando así la traducción viral (Kazuko Shiroki 1999). Otro ejemplo es el de la relocalización de nucleolina de los nucléolos hacia el citoplasma celular, durante la infección con PV y rinovirus. La nucleolina, es una proteína multifuncional, localizada principalmente en los nucléolos, e implicada en la transcripción del RNAr, biogénesis y el ensamblaje de los ribosoma, la maduración de los RNA ribosomales, y del transporte de nucleo-citoplasma (Hervé Ginisty, Helene Sicard y et al. 1991a). La relocalización de nucleolina de los nucléolos hacia el citoplasma celular durante la infección por estos virus, ocurre tras el procesamiento de dos proteínas de los poros nucleares por la acción de la proteasa viral 3C, y su papel es el de promover la síntesis del RNA de PV. Así mismo, en el caso de la infección por el virus HCV, la nucleolina es reclutada en la región perinuclear mediante su interacción con proteínas virales no estructurales, y tiene un papel importante en la replicación viral. Finalmente la nucleolina participa en la infección del virus Herpes simplex tipo 1, (Aleth Calle, 2008) y en la del Citomegalovirus (Blair L. Strang 2010).

Antecedentes en el laboratorio han demostrado que la proteína multifuncional nucleolina, es relocalizada de los nucléolos hacia el nucleoplasma tras la infección con el FCV, lo cual sugiere su participación en la replicación viral.

Dado que los *Norovirus* se replican en el citoplasma, el acceso a proteínas compartimentalizadas en el núcleo, membranas u otros organelos requiere de su relocalización, la cual en muchas ocasiones es inducida por la interacción de proteínas no estructurales, incluyendo las proteasas y por proteasas celulares como caspasas entre otras. Es por ello que resulta relevante investigar como participa 3CD o NS6/NS7 en el establecimiento de la infección viral y si es capaz de modificar o

re-localizar factores celulares a sitios en los que se lleve a cabo la replicación de las partículas virales. De igual manera el determinar si la nucleolina, la cual se relocaliza tras la infección, tiene un papel en la replicación viral, aportaría evidencias a cerca de las proteínas celulares requeridas por el virus para llevar a cabo este proceso.

## **JUSTIFICACIÓN**

Las proteasas virales son determinantes en el establecimiento de una infección viral ya que procesan a la poliproteína viral y participan en el control de procesos celulares para que la replicación viral sea exitosa.

Es poco lo que se conoce al respecto de la localización subcelular de la proteasa de FCV durante la infección y de su actividad sobre la integridad y localización de proteínas celulares, por lo que estudiar ambos procesos permitirá, conocer más acerca de las moléculas y los mecanismos implicados en la replicación de estos virus importantes para la salud animal y humana.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la localización de la proteína viral 3CD durante la infección del FCV, y determinar su actividad sobre moléculas blanco implicadas en la replicación del virus.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Determinar la localización de la proteína 3CD o NS6/NS7 de FCV durante la infección viral
- 2) Clonación, transfección y localización de la 3CD en células eucariotas.
- 3) Analizar si existe alguna modificación en la integridad y/o localización de la proteína nucleolina durante la infección por FCV.
- 4) Analizar el papel funcional de la nucleolina en la infección por el FCV.



## **METODOLOGÍA**

### **DISEÑO DE DOS PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS PRESENTES EN LA REGIÓN DE LA REPLICASA 3D DEL FCV**

Basados en las secuencias de dos péptidos inmunogénicos presentes en la replicasa del virus Norwalk, se buscaron dos secuencias homólogas en la replicasa del FCV. Uno de los péptidos, que contiene la secuencia de aminoácidos: YGLKPTRVDKSV (FCV542pol) se localiza a partir del residuo 542 y el segundo, RQFYIYIKGENSDDWK( FCV662 ), a partir del residuo 588 y se encuentra más expuesto que el primero. Ambos péptidos se ubican en la región carboxilo terminal de NS6/7 (3CD). y fueron proporcionados por la casa Invitrogen Life technologies.

### **INMUNIZACIÓN DE RATONES**

Se inmunizaron ratones machos de 4 a 6 semanas de edad de la cepa Balb/c H-2<sup>d</sup> por vía intraperitoneal según se muestra en la tabla 1. Grupos de 2 ratones fueron inmunizados con 4 dosis, a intervalos de 10 días; antes de cada inmunización se obtuvieron muestras de sangre por la cola. El primer grupo de ratones fue inoculado con el péptido FCV552 pol y un segundo con el péptido FCV662pol.

Inmunógeno administrado	Ratones	1ª Inmunización (ug de inmunógeno)	2ª Inmunización (ug de inmunógeno)	3ª Inmunización (ug de inmunógeno)	4ª Inmunización (ug de inmunógeno)
<b>FCV552pol</b>	<b>2</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>25</b>
<b>FCV662pol</b>	<b>2</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>25</b>

Tabla 1: Esquema de inmunización de cada péptido con los diferentes grupo de ratones.

Después de la cuarta inmunización se obtuvo la sangre de los ratones inmunizados por vía intracardiaca, la cual se incubó a temperatura ambiente (TA) hasta su coagulación. Posteriormente se centrifugó 2 veces a 13000 rpm por un minuto y se recolectó el suero, el cual se alicuotó y se almacenó a -20°C.

## **INMUNIZACIÓN DE CONEJOS**

Se inmunizaron conejos hembras de Nueva Zelanda de 2-3 Kg, por vía intramuscular e intradérmica en intervalos de 15 días, según se muestra en la tabla 2. Antes de la primera inmunización se obtuvieron muestras de sangre por la vena marginal de la oreja (Suero Preimmune. Ambos péptidos fueron inoculados por separado, utilizando adyuvante de Freuds completo e incompleto.

Inmunógeno Administrado	Conejos	1ª Inmunización (ug de inmunógeno)	2ª Inmunización (ug de inmunógeno)	3ª Inmunización (ug de inmunógeno)
Días		0	15	30
FCV552pol	1	500	250	250
FCV662pol	1	500	250	250

Tabla 2: Esquema de inmunización de cada péptido en cada grupo de Conejos.

## **PROPAGACIÓN Y MANTENIMIENTO DE CÉLULAS CRFK**

Células CrFK (células epiteliales de riñón de gato, obtenidas de ATCC) fueron crecidas y mantenidas en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (MEM (Invitro S.A. de C.V.) complementado con 10 % de suero de Caballo (Gibco BRL, Life Technology) y antibióticos (10,000 U/ $\mu$ g/ml de mezcla de penicilina-estreptomicina) (In vitrogen), a 37°C en una atmósfera con 95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las monocapas celulares alcanzaron el 80% de confluencia fueron subcultivadas utilizando tripsina al 1% (Gibco BRL).

## **INFECCIÓN Y PROPAGACIÓN DEL FCV**

Monocapas de células CRFK confluentes se infectaron con (FCV cepa F9) el virus a diferente multiplicidad de infección (MOI). La adsorción del virus se llevó a cabo durante 90 minutos a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> y con movimiento constante a intervalos de 15 minutos en medio MEM completo, libre de suero de caballo posteriormente, se retiró el medio y se añadieron 4 ml de MEM completo al 2% de

suero de caballo, y se incubó a 37°C a diferentes tiempos postinfección en 5% de CO<sub>2</sub>. Para la propagación del virus, la infección se continuó hasta observar un efecto citopático visible por microscopía óptica. Posteriormente las células se congelaron y descongelaron 3 veces para romper membranas y finalmente el sobrenadante se almacenó en alícuotas a -80°C, El título viral se determinó por ensayos de plaqueo.

## **CUANTIFICACIÓN DEL FCV MEDIANTE ENSAYOS DE PLAQUEO**

Monocapas de células CRFK confluentes sembradas en multiplacas de 12 pozos, fueron infectadas con diluciones seriadas del virus. La adsorción del virus se llevó a cabo durante 90 min a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> y con movimiento a intervalos de 15 minutos. Posteriormente se le retiró el virus y a cada pozo se le adicionaron 300 µl de carboximetilcelulosa al 2% diluida en MEM completo a una concentración final de 2% de suero de caballo y se incubó a 37°C por 48 horas en 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado el tiempo se retiró la carboximetilcelulosa y se adicionaron 200 µl de formaldehído al 3.7% en PBS y se incubó por 15 min, se retiró el formaldehído y se adicionó el cristal violeta (0.1gr de cristal violeta, 29.9 ml de etanol absoluto y 70 ml de agua bidestilada esteril) por 10 min, se lavaron las placas y finalmente se secó para su posterior conteo.

## **INACTIVACIÓN DEL FCV CON UV**

Una alícuota de stock viral ( $8 \times 10^6$  pfu/ml) fue colocada en una caja p60 y fue incubada en hielo e irradiada con luz UV (254nm) utilizando una lámpara Ultralum por 15, 30, 45, 60 y 90 minutos a una distancia de 5 cm y con intervalos de movimiento cada 10 min. El virus se colectó y se almacenó en tubos eppendorf de 1.5 ml a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **EXTRACTOS TOTALES (RSB-NP40)**

A monocapas de células CRFK confluentes no infectadas e infectadas se les retiro el medio y se lavaron con PBS, posteriormente se adicionó 1 ml de buffer de amortiguador de despegado (Tris HCl 40 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM), se recolectaron las células en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron las a 4000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos.(Centrifuga refrigerada Sigma K-15) Se retiró el sobrenadante y se le adicionaron 300  $\mu\text{l}$  de la solución RSB-NP40 (10mM Tris-HCl, pH 7.5; 10mM NaCl, 1% NP40) y 1  $\mu\text{l}$  de inhibidores de proteasas (Roche), se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos y se centrifugaron por 15 minutos a 12000 rpm. Los sobrenadantes se transfirieron a un tubo nuevo, se cuantificaron por el método de Bradford y se almacenaron en alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . al igual que la pastilla se empleo para posteriormente obtener extractos nucleares.

## **EXTRACTOS CITOPLASMATICOS**

A monocapas de células CRFK confluentes no infectadas e infectadas se les retiro el medio de cultivo, se lavaron 3 veces con PBS frío, y las células se removieron mecánicamente y se recolectaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se retiro el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en buffer C (10 mM Tris pH 7.8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.3 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.3 M sucrosa, 2 mM ZnCl<sub>2</sub>) e incubada en hielo por 15 minutos. A cada mezcla se la añadió 200 ul de NP40 al 0.5%, se agitaron en vortex y se centrifugaron por 5 min a 3000 rpm a 4°C. El sobrenadante (extractos citoplásmicos) se colectó en un tubos eppendorf de 1.5 ml, se cuantificó por el método de Bradford y se almacenó en alícuotas a -80°C y la pastilla se almacenó de la misma forma para posteriormente obtener extractos nucleares.

## **EXTRACTOS NUCLEARES**

La pastilla obtenida en la metodología anterior, se lavó con amortiguador C (10 mM Tris pH 7.8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.3 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.3 mM sucrosa, 2 esmM ZnCl<sub>2</sub>), y se centrifugó a 2500 rpm por 1 min a 4°C, 2 veces. La pastilla se resuspendió en 50 µl de amortiguador D (20 mM Tris pH 7.8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 320 mM KCl, 0.2 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.3 mM sucrosa, 2 mM ZnCl<sub>2</sub>), se incubó en hielo por 15 minutos y se sónico (Sonics Vibra cell) por 10 segundos. Finalmente se centrifugó a 13000 rpm, por 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un

nuevo tubo, se cuantificó por el método de Bradford y se almacenó en alícuotas a -80°C.

## **ENSAYOS TIPO WESTERN BLOT**

Los extractos proteicos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% (Solución A: acrilamida-bisacrilamida 30%, Solución B: 1.5 M Tris HCl, Solución C: SDS 10%, 0.5 M Tris base, persulfato de amonio 1g/10ml, temed y agua). 50 µg de extractos de las células infectadas y no infectadas, se mezclaron con amortiguador de muestra para proteínas (0.125M Tris 0.5M pH 6.8, 2.5% SDS al 10%, 25% 2-mercaptoetanol, 25% glicerol, 0.1 mg/ml azul de bromofenol) a una concentración final de 0.125M. Las muestras se hirvieron por 10 minutos y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida A 120 V por 1 hr. Posteriormente los geles se equilibraron en amortiguador de transferencia (Tris base 5.82 g, Glicina 2.92 gr. Metanol 100 ml y se afora con agua bidestilada para un litro) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 12 Volts, por 45 min en un aparato de transferencia semi-seca (Biorad). La eficiencia de la transferencia se verifico tiñendo la membrana con una solución de rojo de Ponceu (0.1%). Posteriormente la membrana se bloqueo con 10 ml de TBS-Tween 20 -0.05%-leche-5% (Trisma base 100 mM pH 8, NaCl 1.5M), por 2 horas a temperatura ambiente TA, después se lavó con TBS-Tween 20-0.05%, se adicionó el anticuerpo primario según corresponda, diluido en TBS-Tween (ver Tabla 3) y se incubó toda la noche a 4°C. Transcurrido

este tiempo, la membrana se lavó como se indicó anteriormente, 3 veces por 10 minutos y se adicionó el anticuerpo secundario (cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:10000 y o de cabra anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1:5000). El segundo anticuerpo se incubó a temperatura ambiente por una o dos horas. Después se lavó 3 veces y se reveló con el Kit SuperSignal West Femto (Pierce).

<b>Anticuerpos</b>	<b>Dilución</b>
<b>Anti-542 Policlonal en Conejo</b>	1:500
<b>Anti-662 Policlonal en Conejo</b>	1:500
<b>Actina Monoclonal</b>	1:1000
<b>Calreticulina Policlonal en Cabra (Santa Cruz)</b>	1:2000
<b>Anti- policlonal en Conejo</b>	1:10000
<b>Nucleolina H-23 Monoclonal (Santa Cruz)</b>	1:3000
<b>Nucleolina H-23 Policlonal (Santa Cruz)</b>	1:5000
<b>hNRP A1 Monoclonal (Santa Cruz)</b>	1:10000
<b>PDI Monoclonal (Santa Cruz)</b>	1: 1500

Tabla 3. Relación de anticuerpos y diluciones.



## **INMUNOFLUORESCENCIA PARA LA LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS**

### **VIRALES**

Cubreobjetos pretratados con L-polilisina (100 µg/ml) se colocaron en cajas de 6 pozos en donde se sembraron células CRFK, y se espero hasta alcanzar una confluencia del 80%. Cada pozo se infecto con FCV, con una MOI determinada, que varía de 4 a 10 según el ensayo y a diferentes tiempos postinfección las células se permeabilizaron durante 5 minutos en una solución al 0.03% de paraformaldehído (PFA) y 0.3% Triton X-100, en una solución amortiguadora de citoesqueleto (CB) [10mM de MES, 150mM de NaCl, 5mM de EGTA, 5mM de MgCl<sub>2</sub> y 5mM de Glucosa]. Las preparaciones se lavaron 3 veces con una solución amortiguadora de citoesqueleto CB y se fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA) al 3% durante 20 minutos. Se lavaron nuevamente con PBS 3 veces y se bloquearon con gelatina al 0.5% en PBS durante 40 minutos. Posteriormente las preparaciones se incubaron con anticuerpo primario según corresponda el ensayo (ver tabla) durante toda la noche a 4°C, y se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos. La señales de proteínas de interés se detectó incubando las preparaciones durante 60 minutos con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 594 a temperatura ambiente. Posteriormente las preparaciones se lavaron 3 veces con PBS y por 2 minutos con DAPI para teñir núcleos (1mg/ml). Se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS y agua y se montaron en Vectashield (Vector laboratorios, Inc). Las preparaciones se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Axioimager, Carl Zeiss) y confocal (Leical). Se utilizó el Software Las-AF Lite.

Anticuerpos	Dilución
Anti-542 Policlonal en Conejo	1:100
Anti-662 Policlonal en Conejo	1:100
Anti-VpG Policlonal en Conejo	1:100
Nucleolina policlonal en Conejo (Santa Cruz)	1:100
Nucleolina H-23 Monoclonal (Santa Cruz)	1:100
FCV Monoclonal (Santa Cruz)	1:50

Tabla 4. Relación de anticuerpos y diluciones para Inmunofluorescencias.

## **TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)**

### ***A) OBTENCIÓN DEL RNA DE CÉLULAS CrFK INFECTADAS POR EL MÉTODO DE TRIZOL.***

Se infectaron células CrFK con el FCV y a los tiempos indicados se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS 3 veces y se agregó 1 ml de reactivo de TRIzol (Invitrogene). Se colectó el lisado en un tubo eppendorf y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó 0.2 ml de cloroformo por 1ml de Trizol, se homogenizó por 15 segundos y se incubó de 2-3 minutos en temperatura ambiente. Se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se

transfirió a un nuevo tubo y el RNA se precipitó con isopropanol 0.5 ml, se resuspendió, e incubó 10 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugar a 10000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se retiró y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se resuspendió y se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se retiró la pastilla se dejó secando para posteriormente resuspender en agua DEPC.

### ***B) AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA PROTEASA POLIMERASA 3D O NS7***

La secuencia del gen que codifica para la proteasa-polimerasa 3CD se amplificó por RT-PCR a partir de RNA genómico del FCV. Los oligonucleótidos empleados corresponden a los nucleótidos 3332 al 5311 pb del genoma viral y tienen en su extremo 5`terminal la secuencia de la enzima HindIII, y en su extremo 3' la secuencia de la enzima EcoRI para poder subclonarlo en un vector de expresión eucariótico.

La reacción de amplificación del gen que codifica para la proteína se llevó a cabo en un volumen final de 50 ul, utilizando el RNA de las células infectadas, 5 ul de MgCl<sub>2</sub> (50mM, MgCl<sub>2</sub>), 1ul dNTPs (10 mM, dNTPs), amortiguador de PCR 10X y 0.5U Taq Polimerasa, con 1µl (98 µM) del oligonucleótido sentido y 1µl (130 µM) del oligonucleótido anti-sentido, bajo las siguientes condiciones: 94°C, 2 min, 30 ciclos de

(94°C 30 seg, 63°C 30 seg, 68°C 2 min) y finalmente 68°C 10 min, en un termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400.

El oligonucleótido sentido: TTTAGCTTATGTAGGACCAGGCACCAAGTTCCAC

HindIII

El oligonucleótido antisentido: TTTAAGCTTAACTTCGAACACATCACAGTGTAGGGC

EcoR1

## **CLONACIÓN DEL GENE DE LA PROTEASA POLIMERASA EN EL VECTOR TOPO TA**

En un tubo eppendorf de 0.5 ml se colocaron: 4 µl del producto de RT-PCR, 1 µl del plásmido Vector (TOPO TA CLONING Invitrogene), 1 µl de amortiguadores de ligación (1.2 M de NaCl y 0.06 M de MgCl<sub>2</sub>) y 6 µl de agua. La mezcla de reacción se incubó toda la noche a 4°C, 2 µl de la reacción se usaron para transformar células DH5-α competentes.

## **PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

Una colonia de células DH5α se inoculó en 4 ml de medio SOB (para 1000 ml: disolver en 950 ml de agua bidestilada 20 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl, agregar 10 ml de KCl 250 mM), y se incubó a 37° C toda la noche en agitación(Orbital MRC). Posteriormente se incubaron 55 ul del cultivo de

bacterias y 55 ml de medio SOB a 37° C en agitación durante 4 a 5 horas, o hasta que la densidad óptica del cultivo alcanzó una absorbancia de 0.4-0.6 a una longitud de onda de 550 nm. Las células fueron transferidas a tubos de polipropileno de 50 ml estériles y se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se decanto y la pastilla se resuspendió en FSB (KCl 100mM, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 50 mM, Glicerol 10% p/v, acetato de potasio 10 mM, pH final 6.2) a 4°C, con pipeteo suave durante 15 minutos en hielo. Pasado el tiempo se centrifugó nuevamente y la pastilla, se resuspendió en 2 ml de FSB y 140 ul de DMSO suavemente. Se incubó por 5 min a 4°C, se añadieron otros 140 ul de DMSO y se incubó por 15 min a 4°C. La suspensión se almacenó en alícuotas de 200 ul a -80°C.

## **TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES**

Una alícuota de bacterias competentes se descongeló en hielo, y se incubó con 2 µl de la mezcla de ligación o DNA plasmidico en hielo por 30 min. Posteriormente la mezcla se sometió a un choque térmico a 42° C por 90 segundos, seguido de una incubación a 4°C por 2 minutos. La solución se transfirió a tubos eppendorf con 1 ml de medio SOB y se incubó 1 h a 37°C en agitación constante. La mezcla se espatuló en cajas con LB-ampicilina (100ug/ml) complementadas con 40 ul de una solución X-gal (40mg/ml en dimetilformamida) para la selección de las transformantes. Las cajas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Las colonias blancas se sembraron simultáneamente en placas LB-ampicilina y en 3 ml de medio LB-ampicilina. Tanto las placas como el cultivo se incubaron toda la noche en agitación constante a 37°C. Posteriormente a partir de este cultivo se obtuvieron los plásmidos candidatos.

### **OBTENCIÓN DEL ADN PLASMIDICO**

Las colonias candidatas se cultivaron en 1000 ml de medio LB con un antibiótico de selección a 37°C toda la noche en agitación constante. El cultivo se centrifugo a 6000 rpm por 15 min en una centrífuga BeckMan Coulter, Rotor JA 25.50 a 4°. El sobrenadante se removió y la pastilla se resuspendió en 50 ml de amortiguador P1 [50mM Tris HCl (pH 8); 10 mM EDTA, 100 ug/ml RNAsa A]. Se añadieron 50 ml de amortiguador P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), se mezclaron gentilmente y se incubaron a TA por 5 min. Se añadieron después 50 ml de amortiguador P3 frío (3 M Acetato de Potasio pH 5.5), se invirtieron los tubos de 4 a 6 veces y se incubaron en hielo por 30 min. Se centrifugaron a 11500 rpm por 30 min en una centrifuga BeckMan Coulter, Rotor JA 10 a 4°C, y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se volvió a centrifugar a 11500 rpm/15 min utilizando el rotor JA 10 a 4°C. Paralelamente se equilibró una columna Qiagen-tip 2500 colocando 35 ml de bBuffer QBT [750 mM NaCl; 50 mM MOPS, (pH 7), 15% de isopropanol; 0.15% Triton X-100], y se permitió que la columna se vaciará por gravedad. El sobrenadante se colocó sobre la columna equilibrada y se permitió su paso a través de la columna.

La columna se lavó 2 veces con 100 ml de amortiguador QC [1 M de NaCl, 50 mM MOPS (pH 7), 15 % isopropanol] y el ADN plasmidico se eluyó con 35 ml de amortiguador QF [1.25 M NaCl; 50 mM Tris Cl pH 8.5, 15% isopropanol], en un tubo de 25 ml de policarbonato. El ADN se precipitó añadiendo 24.5 ml de isopropanol a TA, se mezcló y centrifugó a 11000 rpm por 30 min a 4°C en un rotor JA 10. Se lavó la pastilla con 7 ml de etanol al 70% a TA y se volvió a centrifugar a 11000 rpm por 10 min a 4°C en un rotor JA 10. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar, en el mismo tubo invertido. El ADN se resuspendió en 1000 µl de agua ultrapura.

### **CONSTRUCCIÓN DEL PLASMIDO DE EXPRESION 4EGFP-3CD**

El plásmido Topo TA con el gene que codifica para la 3CD o NS6/NS7 se cortó con la enzima de restricción HindIII que flanquea la secuencia que codifica a la proteína 3CD. Así mismo el vector de expresión p4GFP se linearizó utilizando la misma enzima. En general se usan 1U/1µg de enzima en amortiguadores de restricción (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) y la reacción se incubó a 37° C, de 2 a 4 horas. Los productos generados de la reacción de restricción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa, para posteriormente purificarlos por electroelución.

## **A) PURIFICACIÓN DE ADN POR ELECTROELUCIÓN.**

Las bandas de ADN observadas en los geles de agarosa se cortaron y los fragmentos se transfirieron a una cámara de electroelución (Unidirectional Electroelutor, Internacional Biotechnologies), previamente equilibrada con amortiguador TBE (Tris base 0.9M, Ácido Bórico 0.9M, EDTA 10 mM). En los canales en forma de V de la cámara se colocaron 100µl de una solución de acetato de amonio 10M con ayuda de una micropipeta, procurando que no se formaran burbujas. Las muestras se sometieron a electroforesis a 100 volts por 90 min y transcurrido el tiempo se retiró la solución de acetato de amonio la cual lleva el ADN. La muestra se diluyó en TBE hasta bajar la molaridad del acetato a 2.5M. Las muestras se transfirieron a tubos eppendorf, y se les añadió 1ml de etanol absoluto para precipitar en ADN a -20°C toda la noche. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm por 30min a 4°C, y la pastilla se lavó con etanol al 70%. La muestra se volvieron a centrifugar a 14000 rpm por 30min a 4°C y el sobrenadante se decantó y se deja secando la pastilla. Una vez eliminadas las trazas de etanol, la pastilla se resuspendió en agua ultrapura.

### **c) DESFOSFORILACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN**

#### **PLASMIDICO**

600 ng de plásmido linearizado se diluyeron en 20 µl y se le añadió 1µl de CIP (fosfatasa alcalina), 2 µl de amortiguador de CIP 10 X y 2 µl de agua a un volumen



final de 20  $\mu$ l y se incubó a 37° durante 30 minutos. Se adicionó un  $\mu$ l de CIP (Biolabs) y se incubó nuevamente a 37°C por 30 minutos. La muestra se llevó a 100  $\mu$ l con agua y posteriormente se purificó siguiendo el método antes mencionado.

### **C) ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA**

Los geles de agarosa fueron preparados disolviendo la concentración requerida de agarosa en TBE/10  $\mu$ g/ml con bromuro de etidio e disolviendo la mezcla en un horno de microondas hasta que estuviera homogénea,. La solución se vertió en una base para geles, se colocó un peine para la formación de los pozos, y se permitió que la solución se gelifique. Las muestras de ADN se diluyeron en amortiguador de carga (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xilen cianol y 30% de glicerol en agua) y se colocaron en el gel. En el gel se incluyen 2  $\mu$ l (100 ng) de marcador de peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo en amortiguador TBE a 120 Volts hasta que el frente del marcador migrara un 75% del gel. La presencia de las bandas de ADN se visualizó en un transiluminador de luz UV (Transilluminator UVP).

### **REACCIONES DE LIGACIÓN**

Las reacciones de ligación se realizaron utilizando 400U/ $\mu$ l ligasa de ADN T4, en un amortiguador de ligación 5X (66mM Tris-HCl pH 7.6, 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 66  $\mu$ M ATP) en un volumen final de 20  $\mu$ l, a 4°C durante toda la noche, en una

relación 1:3 de plásmido-inserto. Estas ligaciones se usaron para transformar células DH5- $\alpha$  competentes, como se menciona anteriormente.

## **TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CrFK POR EL METODO DE LIPOFECTAMINA UTILIZANDO p4EGFPSV40, p4EGFP y 4GFP3CD**

Células CrFK se transfectaron transitoriamente con los plásmidos 4EGFP, p4EGFPSV40 y 4GFP3CD. La transfección se realizó utilizando el agente de transfección lipídico lipofectamina™ 2000 (Invitrogen Life Technologies) como se describe a continuación: Se sembraron  $3 \times 10^5$  células 24 horas antes de la transfección en MEM suplementado con suero 10%. Por otro lado se diluyeron 15  $\mu$ l de lipofectamina en 100  $\mu$ l de medio Optimen; y a la par se diluyeron 10  $\mu$ g de DNA en 100  $\mu$ l de medio Optimen. Ambas soluciones se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, se mezclaron y se incubaron por 45 minutos a TA. Posteriormente se adicionaron 800  $\mu$ l de medio Optimen a cada tubo y se incubaron por 10 minutos. Finalmente el volumen total se añadió a las células y se incubaron por 5 horas a 37°C y posteriormente se cambió el medio de transfección por medio fresco.

## **TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CrFK UTILIZANDO pEGFP y GFP3CD**

### **o NS6/NS7 POR EL METODO DE ELECTROPORACIÓN**

Células CrFK fueron transfectadas transitoriamente por electroporación (Gene Pulser X Cell Biorad) con los plásmidos EGFP y GFP3CD. La transfección se realizó utilizando un electroporador (Biorad), como se describe a continuación: Se sembraron  $3 \times 10^5$  células 48 horas antes de la transfección, con MEM complementado con suero 10%. Las células fueron desprendidas de los pozos con 400  $\mu$ l de medio Optimem y colocadas en cubetas para electroporación. Se adicionaron 10  $\mu$ g de DNA (EGFP y GFP3CD) y se incubaron en hielo para posteriormente someterlas a un pulso de 250 Volts por 0.30s en el electroporador, con el protocolo específico para células de mamíferos (Cuadrática). Finalmente, las células electroporadas se sembraron sobre cubreobjetos contenidos en placas de 6 pozos con el sustrato de L-Polilisina, adicionando medio MEM suplementado y se analizaron por fluorescencia 24 y 48 hrs post-transfección en un microscopio de inmunofluorescencia.

## **AISLAMIENTO DE COMPLEJOS REPLICATIVOS A PARTIR DE**

### **CELULAS CrFK.**

Monocapas de células CrFK fueron sembradas en frascos de 150  $\text{cm}^2$  e infectadas a una MOI de 10. La absorción del virus se llevó a cabo como se describió anteriormente. Las células fueron removidas de la superficie del frasco con

un raspador celular y colocadas en un tubo de 15 ml, para posteriormente centrifugar a 1650 rpm por 5 min a 4°C, se retiró el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 250  $\mu$ l de amortiguador TN frío (Tris 10 mM pH 7.8, NaCl 10 mM) y se dejó incubando por 15 min en hielo, posteriormente las células se lisaron con 60 golpes en un homogenizador, en frío. El lisado fue transferido a un tubo eppendorff de 1.5 ml y se centrifugo a 3000 rpm por 5 min a 4°C, el sobrenadante se paso a un tubo nuevo de 1.5 ml y la pastilla (P1) se resuspendió en 60  $\mu$ l de amortiguador TN con 15% de glicerol y se guardó a -80°C. El sobrenadante se centrifugo por 20 min a 14000 rpm a 4°C, posteriormente el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 ml y se le asigno el nombre de S y se guardo a -80°C. La pastilla (P2 los complejos replicativos) se resuspendió en 60  $\mu$ l de amortiguador TN con 15% de glicerol y se almacenó a -80°C.

### **EXTRACTOS TOTALES CON BUFFER TN**

Monocapas de células CrFK fueron sembradas en frascos de 150 cm<sup>2</sup> e infectadas a una MOI de 10. Las células fueron removidas de la superficie del frasco con un raspador celular y fueron colocadas en un tubo de 15 ml, para posteriormente centrifugarse a 1650 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se retiró y a pastilla se resuspendió en 100  $\mu$ l de amortiguador TN frío con 15% de glicerol para almacenarse en alícuotas a -80°C.

# ENSAYOS DE INTERFERENCIA DEL GENE DE LA PROTEINA NUCLEOLINA

## A) DISEÑO Y SINTESIS DE siRNAs

La secuencia del gen que codifica para el extremo carboxilo-terminal de nucleolina de felino se amplificó por RT-PCR a partir del RNA total de células CrFKs. Se utilizaron un par de oligonucleótidos para la amplificación de aproximadamente 1200 bases del extremo carboxilo-terminal de la proteína nucleolina de murino, basándonos en las secuencias conservadas de los genes que codifican para la nucleolina de diferentes especies (GenBank). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación:

El oligonucleótido sentido: GCGGCCGCATGGTGAAGCTCGCAAAG

El oligonucleótido antisentido: GCGGCCGCATGTCAGAACCAACTACACC

Una vez obtenido el cDNA, éste se mando a secuenciar para posteriormente diseñar los siRNAs que tienen como blanco los mRNAs de nucleolina.

Una vez obtenida la secuencia, ésta se analizó mediante varios programas computacionales que permiten el diseño de los siRNAs que reconocen al mRNA de la nucleolina:

[www.rnaiweb.com/RNAi/RNAi\\_Web\\_Resources/RNAi\\_Tools\\_Software/Online\\_siRNA\\_Design\\_Tools/index.html](http://www.rnaiweb.com/RNAi/RNAi_Web_Resources/RNAi_Tools_Software/Online_siRNA_Design_Tools/index.html).

Se diseñaron y se obtuvieron dos siRNAs duplexes (Applied Biosystems (México)).

siRNA 1: 5'GCUUUAAAUCCUGUAAUAAA 3'

siRNA 2: 5'CACUUUUGGCUAAAUCUgGC 3'.

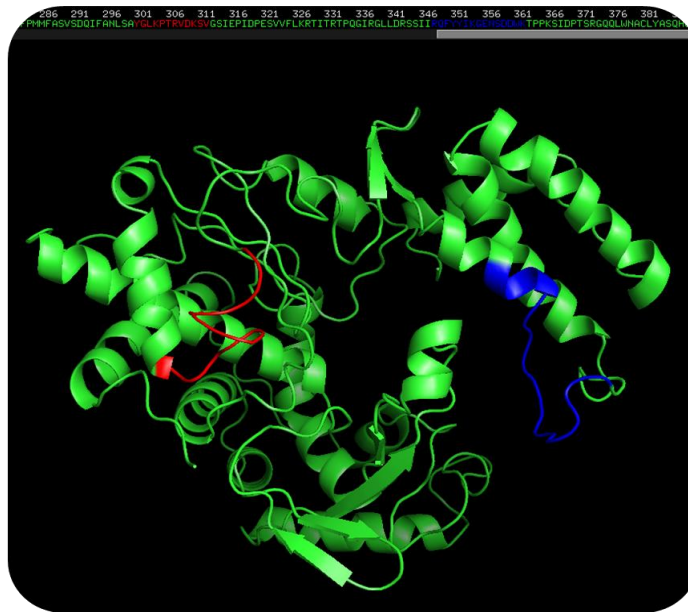
## **B) ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN DE LOS siRNAs CONTRA EL RNAm DE LA NUCLEOLINA EN CÉLULAS CrFK.**

Se sembraron monocapas de células CrFKs en placas de 6 pozos a una confluencia del 60%, a las 24 horas después, las células se transfectaron con el agente de transfección siPORT amine (Ambion) como se describe a continuación: se diluyeron 5 µl de siPORT en 100 µl de medio Optimen; y a la par se diluyeron 60 nm de siRNAs de nucleolina en 100 µl de medio Optimen. Ambas soluciones se incubaron por separado, 5 min a TA, se mezclaron y se dejaron incubando por 10 min adicionales. Posteriormente se adicionaron 800 µl de medio Optimen a cada tubo, se incubaron por 10 minutos y la mezcla se añadió a las células, las cuales se incubaron por 8 horas a 37° C en incubadora de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido este tiempo, se adicionó el mismo volumen de medio completo y las células se incubaron 48 hrs para su posterior procesamiento.

## **RESULTADOS**

### **EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI- 3CD O NS6/NS7, GENERADOS EN RATONES Y CONEJOS INMUNIZADOS**

Se diseñaron dos péptidos cuyas secuencias conservadas entre los diferentes calicivirus se localizan en el carboxilo terminal de la proteasa-polimerasa (3CD) del FCV. El análisis in silico de los péptidos determinó que el péptido FCV542pol (YGLKPTRVDKSV), localizado a partir del residuo 542, se encuentra poco expuesto en el contexto conformacional, de la proteína mientras que el segundo péptido, llamado FCV662 (RQFYIYIKGENSDDWK), se localiza a partir del residuo 588 y se encuentra totalmente expuesto (Figura 1). La proteína fue modelada en el programa: The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling (<http://swissmodel.expasy.org/>) y la visualización se realizó en el programa PyMol versión 0.98.



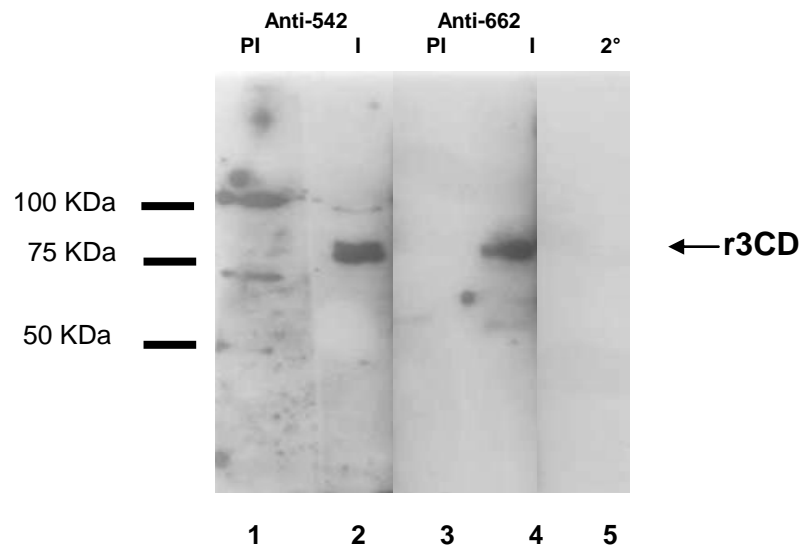
**Figura 1. Modelado de la región carboxilo terminal de la proteína NS6/NS7 (3CD) de FCV.** En rojo se muestra el Péptido FCV542pol (YGLKPTRVDKSV) y en azul el péptido FCV662 (RQFYIYIKGENSDDWK). La proteína fue modelada en el programa The SWISS

Ambos péptidos fueron inmunizados por separado en ratones, sin embargo los anticuerpos generados no detectaron a la proteína recombinante 3CD o NS6/NS7 de FCV. Por esta razón se procedió a inmunizar conejos. Esto se hizo por vía intradérmica e intramuscular a intervalos de 15 días, con la finalidad de obtener anticuerpos en contra de estas regiones de la proteína 3CD.

Los anticuerpos generados en conejo se analizaron mediante la técnica de Western Blo (WB) para determinar si eran capaces de reconocer a la proteína recombinante His-3CD o NS6/NS7 (r3CD) del FCV, previamente obtenida en el laboratorio. Los anticuerpos policlonales anti-542 y anti-662 de Conejo diluidos 1:3000 reconocieron una banda de 76 KDa que corresponde al peso molecular de la proteína



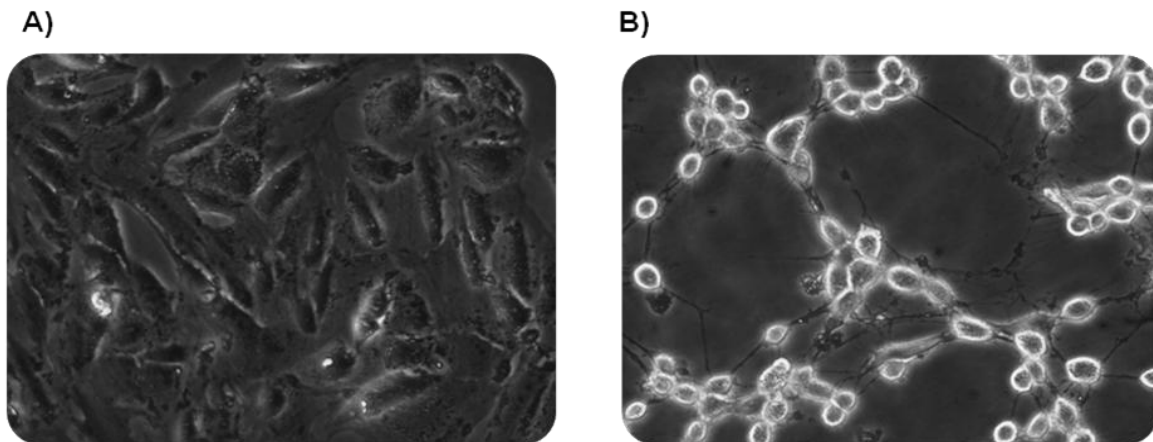
r3CD o NS6/NS7del FCV (Figura 2, carriles 2 y 4 respectivamente). Aunque el suero preinmune del anti-542 reconoce dos bandas de aproximadamente 100 y 50 KDa, ninguna de ellas se detectó con los sueros inmunes, los cuales permitieron el reconocimiento de una banda de 76 KDa que corresponde a la r3CD. Con estos resultados podemos concluir que ambos anticuerpos reconocen a la proteína r3CD o NS6/NS7de FCV.



**Figura 2. Detección de la proteína r3CD o NS6/NS7 con los anticuerpos policlonales anti-3CD o NS6/NS7 por Western Blot.** Sueros preinmunes (PI) (carriles 1 y 3), y sueros inmunes (I) de los conejos inmunizados con el péptido 542 (carril 2) y 662 (carril 4). Control del anticuerpo secundario (carril 5). La banda de 76 KDa señalada por la flecha indica la migración de la r3CD.

## **ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN DEL FCV EN CÉLULAS CrFK**

Una vez corroborado que los anticuerpos reconocían a la proteína recombinante era importante determinar si estos también reconocían a la proteína 3CD o NS6/NS7 nativa en el contexto de células infectadas con el FCV. Para ello inicialmente se establecieron las condiciones de infección de las células CRFK con este virus. El primer indicio de infección se determinó mediante la observación de un marcado efecto citopático a partir de las 6 horas de infección, caracterizado por el redondeamiento y pérdida de adherencia de las células, en comparación con las células no infectadas que se observaban adheridas y presentando con una morfología alargada (Figura 3, panel A y B respectivamente).

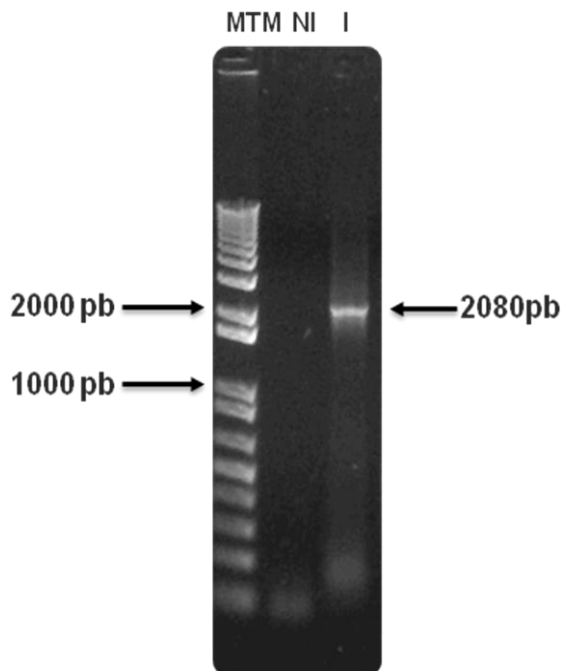


**Figura 3. Microscopía por contraste de fase de células CrFK infectadas con FCV.** A) células CrFK infectadas con el FCV por 6 hrs. B) células CrFK no infectadas (40x).

## DETECCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES DEL FCV POR RT-PCR Y

### ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Para determinar que el efecto citopático fue producido por la infección, se amplificó por RT-PCR al RNA viral. Utilizando los oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia que codifica la proteína 3CD, se realizaron los ensayos de amplificación por RT-PCR. Como podemos observar en la figura 4, a partir del RNA total de las células infectadas, logramos amplificar una banda de 2080 pb, que corresponde al tamaño esperado del gen de la 3CD la cual no fue observada cuando se usó como templado RNA de células no infectadas.

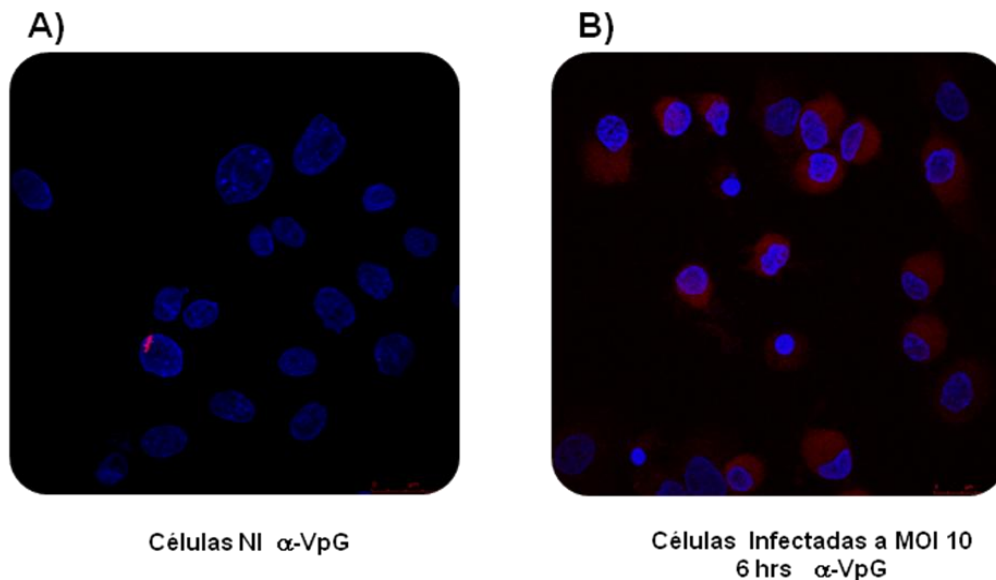


**Figura 4. Reacción de RT-PCR a partir de células no infectadas.** (carril NI) e infectadas con el FCV (carril I). Marcador de tamaño molecular de 1Kb plus (carril MTM). La banda de 2080 pb que corresponde al cDNA de la 3CD o NS6/NS7del FCV se señala con una flecha.

Para terminar de corroborar que las células estaban infectadas se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando células CrFK no infectadas e infectadas a 6 horas

post-infección utilizando el anticuerpo anti-VpG. En la figura 5 se observa la detección de la proteína VpG en el citoplasma de las células infectadas (Figura 5B), mientras que en las células no infectadas no se observó ninguna señal (Figura 5A).

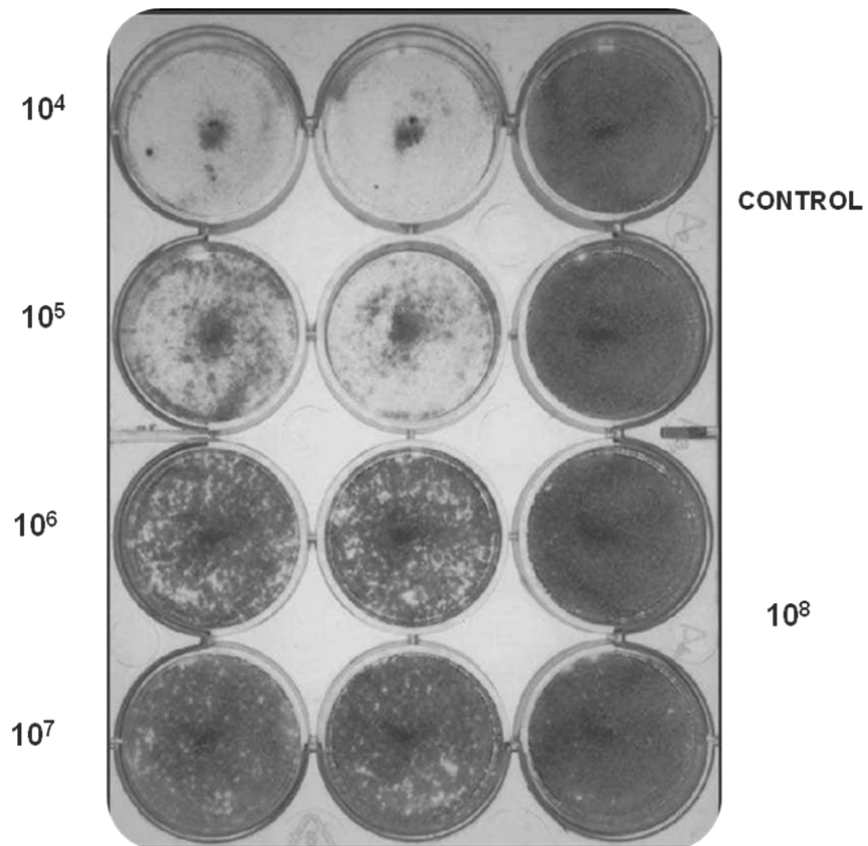
Con estos resultados pudimos confirmar que el FCV con el que contábamos se encontraba viable y capaz de infectar adecuadamente a las células CrFK por lo cual procedimos a titularlo por la técnica de plaqueo.



**Figura 5. Detección de la proteína viral VpG de FCV en células CrFK infectadas por ensayos de Inmunofluorescencia.** A) células no infectadas (63X) y B) células infectadas con el FCV por 6 horas con una MOI de 10, con el anticuerpo primario anti-VpG y secundario Alexa Fluor 594. La señal de la proteína VpG se observa que tiñe en rojo en citoplasma (63X).

Una vez que se determinó que las células estaban infectadas con el FCV, se procedió a cuantificar al virus mediante ensayos de plaqueo (Figura 6).

La cuantificación de las placas líticas nos permitió calcular el título viral que fue  $3.8 \times 10^8$  virus/ml.



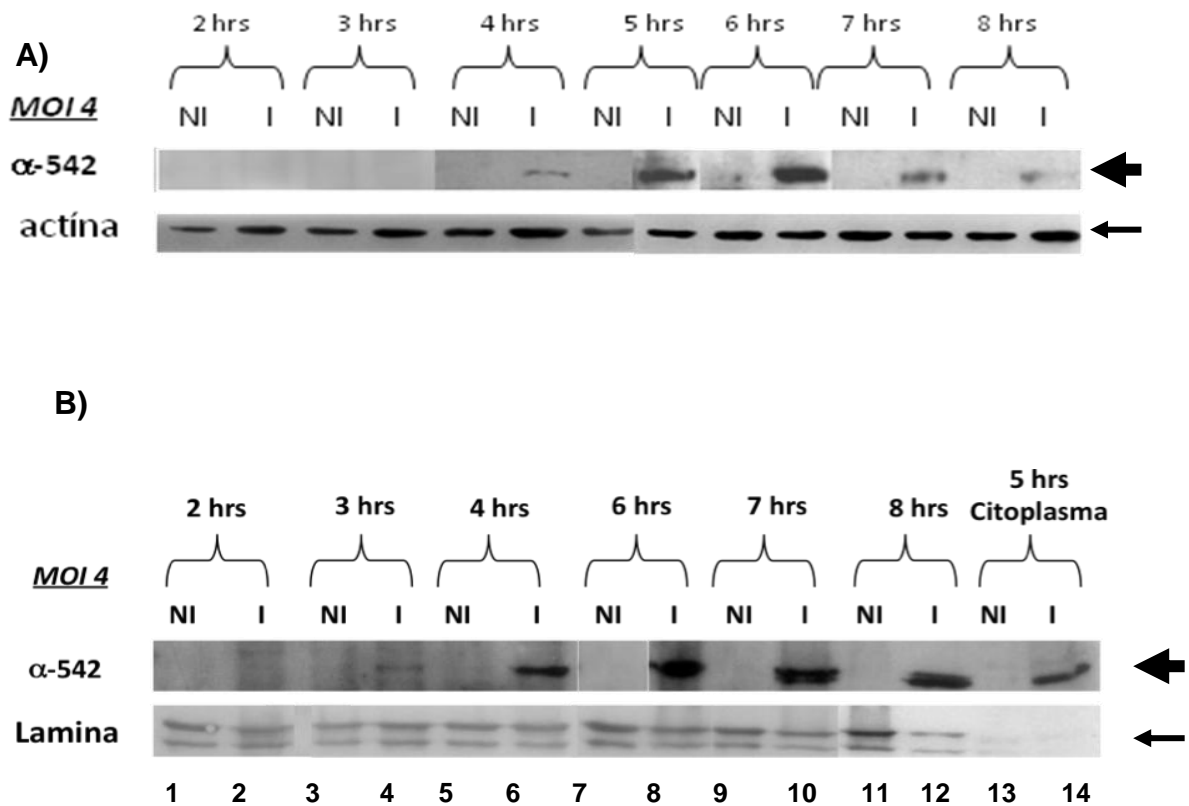
**Figura 6. Titulación viral mediante el método de plaqueo con Carboximetilcelulosa.** Células CrFK confluentes fueron infectadas con diluciones seriadas del FCV y tras 48 hrs de incubación se cuantificaron las placas virales y se calculó el título viral por ml.

## **DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA 3CD o NS6/NS7A DIFERENTES**

### **TIEMPOS DE INFECCIÓN CON EL FCV.**

Para determinar si los anticuerpos generados en conejo eran capaces de reconocer a la proteína 3CD o NS6/NS7 en células infectadas, se infectaron células a una MOI de 4 y se obtuvieron extractos proteicos citoplásmicos y nucleares de células no infectadas e infectadas a partir de la primera hora y hasta las 8 horas de infección. Con estos extractos se realizaron ensayos de WB con los anticuerpos anti-542 y anti-662 previamente obtenidos y evaluados. Con el uso del anticuerpo anti-542 detectó una banda de 76 KDa a partir de las 4 horas de infección que corresponde al peso molecular de la 3CD o NS6/NS7 y que no fue observada en las células no infectadas (Figura 7A), indicando que los anticuerpos eran capaces de detectar a esta proteína 3CD o NS6/NS7 en células infectadas. El incremento en la cantidad de proteína viral a las 5 y 6 hpi, indica la progresión de la replicación, comparada con el control de carga (actina).

Una vez determinada la efectividad de estos anticuerpos, decidimos investigar si la proteasa-polimerasa 3CD o NS6/NS7 se localizaba exclusivamente en el citoplasma o tenía una localización nuclear, para lo cual se realizaron ensayos de WB con extractos nucleares. Los anticuerpos anti-542, fueron capaces de detectar una banda de 76 KDa que corresponde a la 3CD o NS6/NS7a partir de las 3 horas de infección en extractos nucleares (Figura 7B). Para verificar que los extractos eran nucleares se utilizó como control el anticuerpo contra las proteínas nucleares Lámina A/C, que tiene un peso molecular de 62 y 69 KDa respectivamente Figura 7B.



**Figura 7. Detección de la proteína 3CD o NS6/NS7 en extractos citoplásmicos y nucleares de células CrFK infectadas por ensayos de WB.** A) Extractos citoplásmicos obtenidos a partir de células no infectadas (carriles noes) e infectadas (carriles pares) a diferentes horas (carriles 1-14). Los anticuerpos anti 542 detectan una banda de 76 KDa en los extractos infectados a partir de las 4 hrs. Carril inferior, control de carga (Actina). B) Extractos nucleares obtenidos de células no infectadas (carriles noes) e infectadas (carriles pares) a diferentes horas (carriles 1-14) incubados con el mismo anticuerpo, el cual detecta una banda de 76 KDa en las células infectadas a partir de las 3 horas de infección marcados con la flecha gruesa y control de carga Lámina (Carriles: 1-14) banda de 69 y 62 KDa marcados con la flecha delgada.

Estos anticuerpos nos permiten concluir que el anticuerpo anti-542 reconoce específicamente a la proteína viral 3CD o NS6/NS7 en células infectadas y que la 3CD

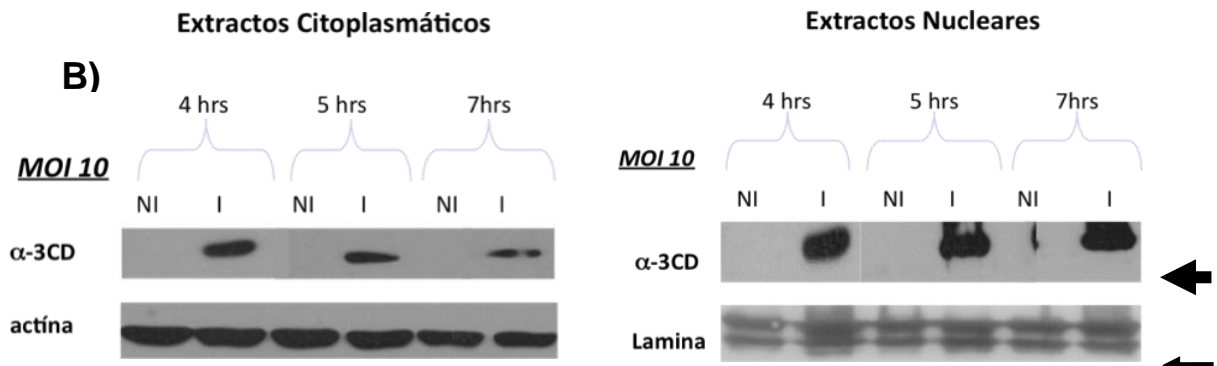
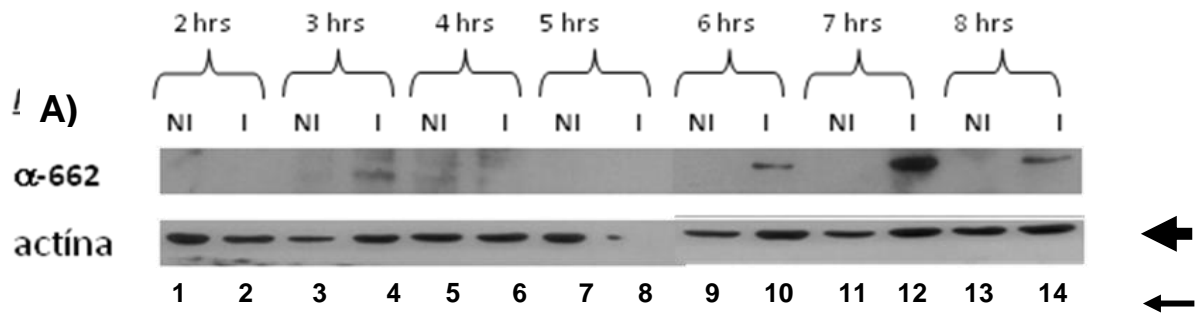
o NS6/NS7 se expresa a partir de las 4 horas de infección en ensayos de WB tanto en extractos nucleares como citoplásmicos.

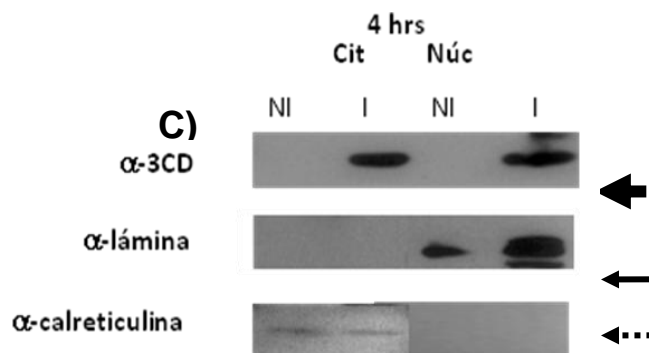
La reactividad de los anticuerpos anti-662 también se evaluó en ensayos de WB y se encontró que también reconoce a la 3CD, solamente en células infectadas pero a partir de las 6 (Figura 8A). Como control de carga se utilizaron anticuerpos contra actina, con los cuales se detectó una banda de un peso molecular de 43 KDa, como se esperaba (Figura 8A, anti-Actina, panel inferior). Estos resultados nos permiten concluir que el anticuerpo 662 tiene la capacidad de reconocer a la proteína 3CD o NS6/NS7 en el contexto de células infectadas y que este anticuerpo detecta a al 3CD o NS6/NS7a partir de las 6 horas de infección.

Para corroborar los resultados obtenidos de los ensayos de WB, se utilizaron anticuerpos anti 3CD o NS6/NS7 que fueron generados y probados en otro laboratorio.

Los ensayos se realizaron en las mismas condiciones que los descritos en la Figura 7 y 8A. En la figura 8B se observan extractos Citoplasmáticos infectados a una MOI de 10 y no infectados en los cuales se detecta a la 3CD a partir de las 4 horas de infección y lo mismo se observa en extractos Nucleares Figura 8B, finalmente para corroborar que los extractos citoplásmicos no se encontraban contaminados durante el proceso metodológico se procedió a utilizar un anticuerpo que solo reconoce proteínas del núcleo como lamina A/C donde se observó una banda de aproximadamente 68 KDa solo en extractos nucleares y para verificar que los extractos nucleares no estuvieran contaminados se utilizó un anticuerpo anti-calreticulina de un peso aproximado de 50 KDa como se observa en la figura 8C.







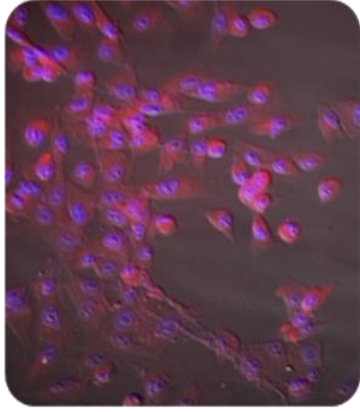
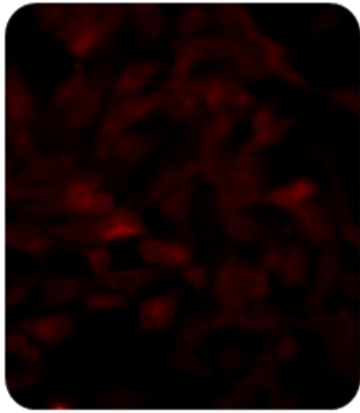
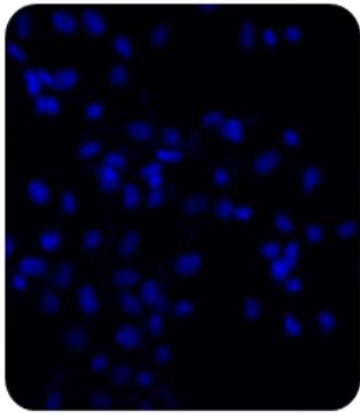
**Figura 8. Detección de la proteína 3CD o NS6/NS7 en citoplasma de CrFK infectadas por ensayos de WB.** A) Detección de la proteína viral 3CD o NS6/NS7 con los anticuerpos anti-662 en extractos citoplásmicos de células infectadas a las 6, 7 y 8 hrs (carriles 10, 12 y 14 respectivamente) y no así en células no infectadas (carriles noes). Carril inferior, control de actina. La flecha gruesa indica la proteína viral 3CD o NS6/NS7 y la delgada a la actina B). Detección de la proteína 3CD o NS6/NS7 con el anticuerpo donado por el Dr. Ian Goodfellow en extractos citoplasmáticos y nucleares de CrFK infectadas por ensayos de WB. a) Detección de la proteína 3CD o NS6/NS7 en extractos citoplásmicos infectados a las 4, 5 y 7 hrs. Control de carga actina (flecha delgada). b) Detección de la proteína viral 3CD o NS6/NS7 en extractos nucleares de células infectadas a las 4, 5 y 7 horas de infección (I), (flecha gruesa) y como control de carga anti-lamina (flecha delgada. C) Detección de la proteína viral 3CD o NS6/NS7 en extractos citoplásmicos y nucleares infectados (I) marcados con una flecha gruesa. Para verificar que los extractos fueron realmente nucleares se utilizo el anticuerpo anti-Lamina que detecta una banda de 68 KDa solamente en extractos nucleares (carriles 3 y 4) marcados con una flecha delgada. Finalmente para verificar que los extractos nucleares no estuvieran contaminados con membranas se utilizo el anticuerpo anti-calreticulina que detecta una banda de 50 KDa solamente en extractos citoplásmicos marcados con una flecha punteda.

**ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE LA PROTEASA POLIMERASA**  
**(3CD o NS6/NS7) EN CÉLULAS INFECTADAS POR**  
**INMUNOFLUORESCENCIA.**

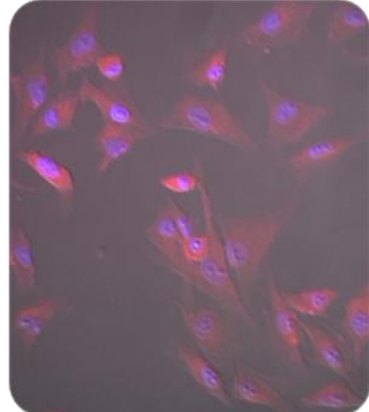
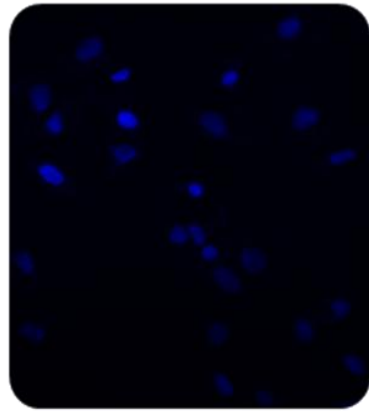
Los ensayos previos nos sugirieron que la proteína 3CD de FCV era capaz de localizarse al menos en dos compartimientos: el citoplasma y el núcleo. Para corroborar esta localización subcelular en células infectadas se realizaron ensayos de microscopía de Inmunofluorescencia con los anti 542 y 662. .

Cuando utilizamos el anticuerpo anti-542, la señal fluorescente en células infectadas y no infectadas fue de igual intensidad (Figura 9A y B respectivamente), lo que nos sugirió que aunque este anticuerpo era muy útil para detectar a la proteína en ensayos de WB, no es el más adecuado para la detección de la proteína 3CD o NS6/NS7 por inmunofluorescencia. El control del anticuerpo secundario no muestra ninguna señal, como se esperaba (Figura 9C).

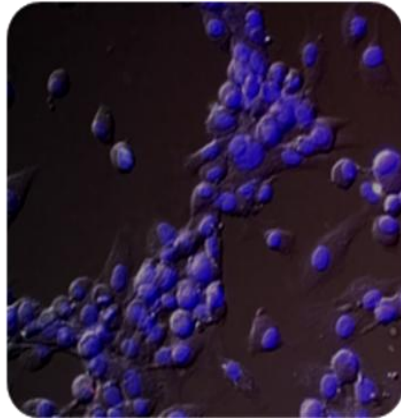
**A)**



**B)**



C)



**Control de anticuerpo secundario**

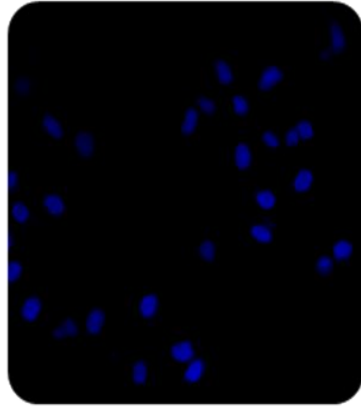
**Figura 9. Detección subcelular de la proteína 3CD o NS6/NS7 en células infectadas con FCV por inmunofluorescencia.** A) células no infectadas. B) células infectadas C) Control de anticuerpo secundario (40X). Tinción de núcleos con DAPI se observa en azul y la tinción en rojo corresponde al anticuerpo secundario con Alexa Fluor anti –Rabbit 594.

Sin embargo cuando se utilizó el anticuerpo anti-662 bajo las mismas condiciones experimentales y con infecciones a una MOI de 2 y 4 horas pi, se observó claramente la detección de la señal específicamente en las células infectadas (Figura 10 B). La señal se observa preferencialmente en el citoplasma con una menor proporción en el núcleo celular mientras que en las células no infectadas no se observó ninguna señal (Figura 10 A panel superior), lo que demuestra la especificidad de los anticuerpos anti-662. El control del anticuerpo secundario no mostró ninguna señal como se esperaba (Figura 10C).

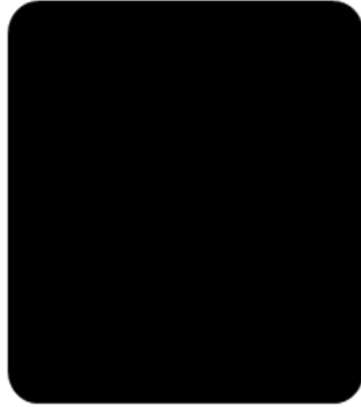
A)



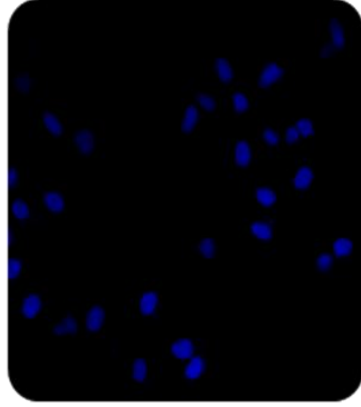
Normaski



Tinción DAPI

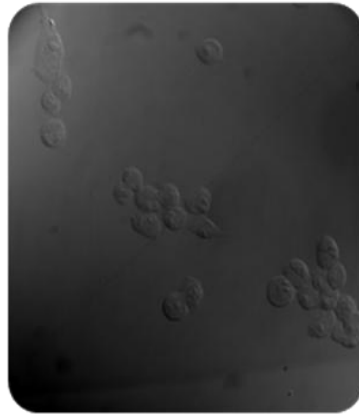


Alexa fluor 594

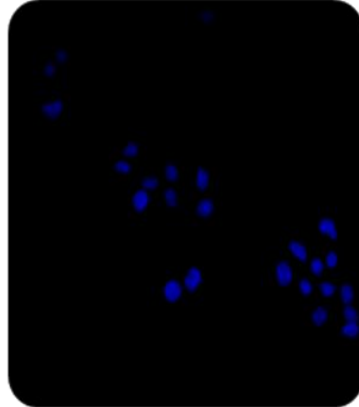


Merge

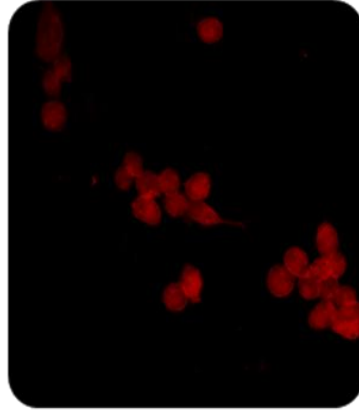
B)



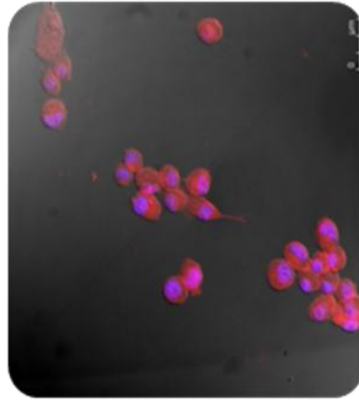
Normaski



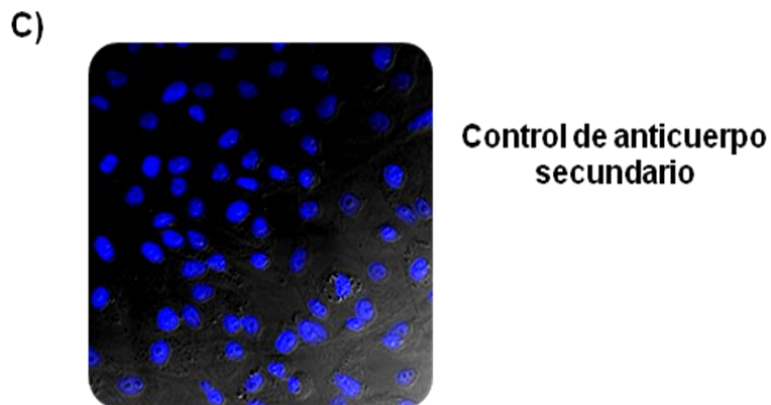
Tinción DAPI



Alexa fluor 594



Merge

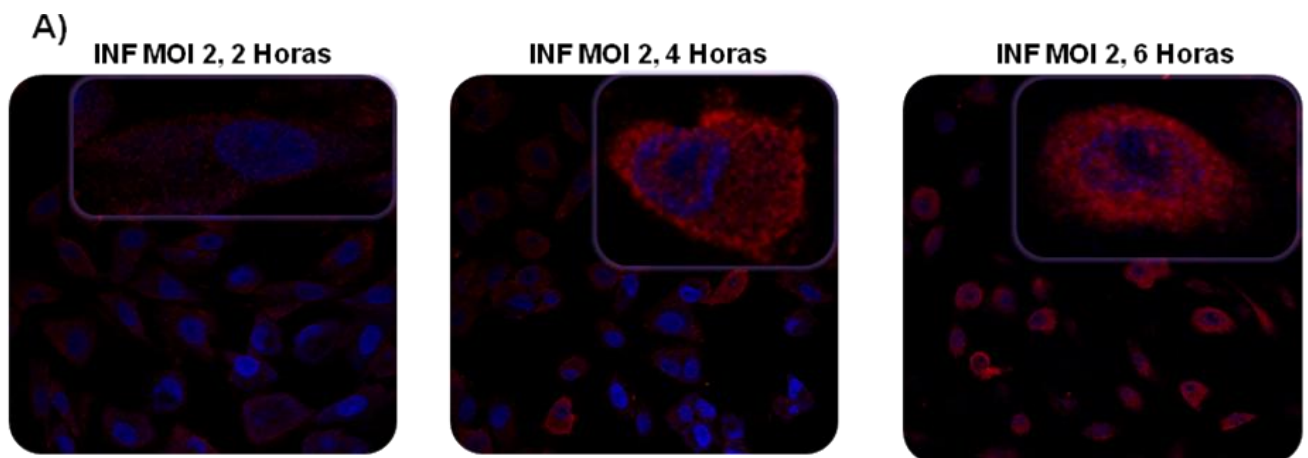


**Figura 10. Detección de la proteína 3CD o NS6/NS7 en células CrFK infectadas por ensayos de Inmunofluorescencia.** A) Células no infectadas (panel superior) (40X) y células infectadas con el FCV por 4 horas con una MOI de 2 (panel inferior), fueron interaccionadas con el anticuerpo anti-662. La señal de la proteína 3CD o NS6/NS7. Se observa en rojo (Alexa Fluor anti-Rabbit 594) tanto en citoplasma como núcleo (40X) y C) Control del segundo anticuerpo. En azul tinción con DAPI para observar núcleos.

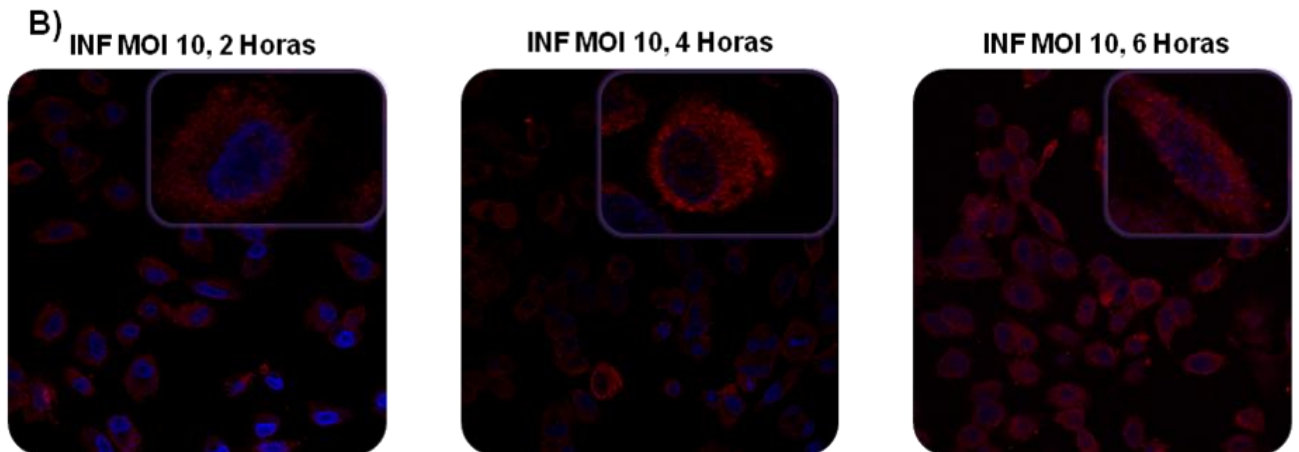
Estos datos corroboraron los obtenidos mediante WB en los que se determinó que la 3CD o NS6/NS7 se localiza en citoplasma y en menor proporción en el núcleo de células infectadas y con ello podemos concluir que el anticuerpo anti-662 detecta a la 3CD o NS6/NS7 en el contexto de células infectadas, y nos sugiere ser una herramienta adecuada para ser utilizada en ensayos de inmunofluorescencia..

Una vez que se observó que el anticuerpo anti-662 detectaba específicamente a la 3CD o NS6/NS7 sólo en células infectadas se procedió a realizar una cinética de

infección para posteriormente evaluarla por Inmunofluorescencia con la finalidad de analizar la localización subcelular de esta proteína a los diferentes tiempos post-infección. En la figura 11A se muestran células infectadas a diferentes tiempos a una MOI de 2, donde se puede observar que a partir de las 2 horas post-infección se empieza a detectar a la 3CD o NS6/NS7 en el citoplasma celular. A las 4 hpi, se observa mayor intensidad de señal, la cual se incrementa aún más a las 6 hpi. En los tiempos 4 y 6 se detecta reactividad en el núcleo, aunque en menor intensidad que en el citoplasma, lo que sugiere la presencia de 3CD o NS6/NS7 en este compartimiento. Este comportamiento se observó de manera similar cuando las células se infectaron a una MOI de 10, con una mayor reactividad con el anticuerpo en el citoplasma pero, a diferencia del experimento anterior se observa desde las 2 hpi (figura 11B).

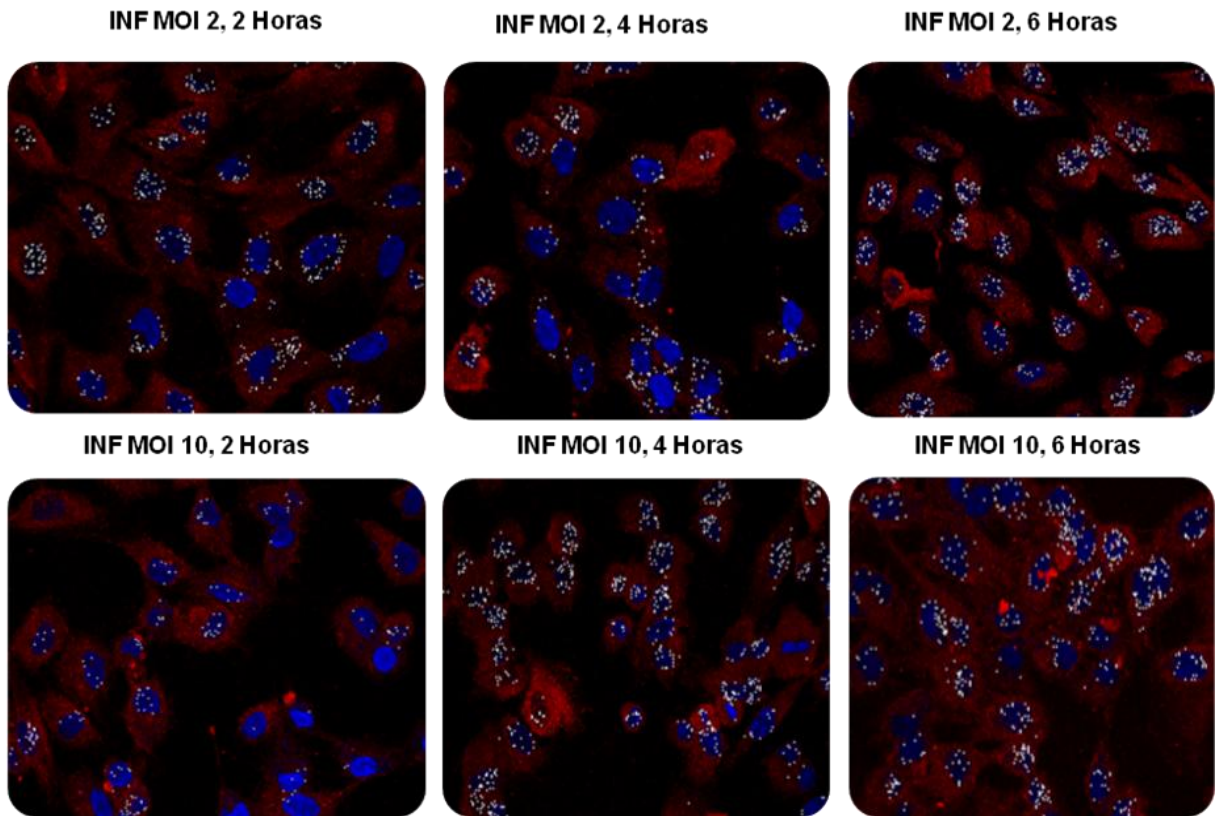






**Figura 11. Localización subcelular de la proteína viral 3CD o NS6/NS7a diferentes tiempos post-infección.** Células infectadas a una MOI de 2 (A) y de 10 (B) fueron tratadas con el anticuerpos anti-662 a alexa Fluor anti-Rabbit a los tiempos de 2 hrs, 4 hrs y 6 hrs. La proteína 3CD o NS6/NS7 está localizada en el núcleo y el citoplasma de células CrFK infectadas con FCV en rojo y en azul se encuentran teñidos los núcleos.

Con la finalidad de corroborar la presencia de la proteasa polimerasa (3CD) en el núcleo celular, se realizó una colocación entre el marcaje del colorante DAPI (nucleo) y la proteína 3CD o NS6/NS7(rojo). Esta colocalización se indica con una marca blanca, que se observa principalmente en la periferia nuclear y en algunas regiones nucleares La colocalización se realizó a una MOI de 2 y 10 (figura 12A y B respectivamente).

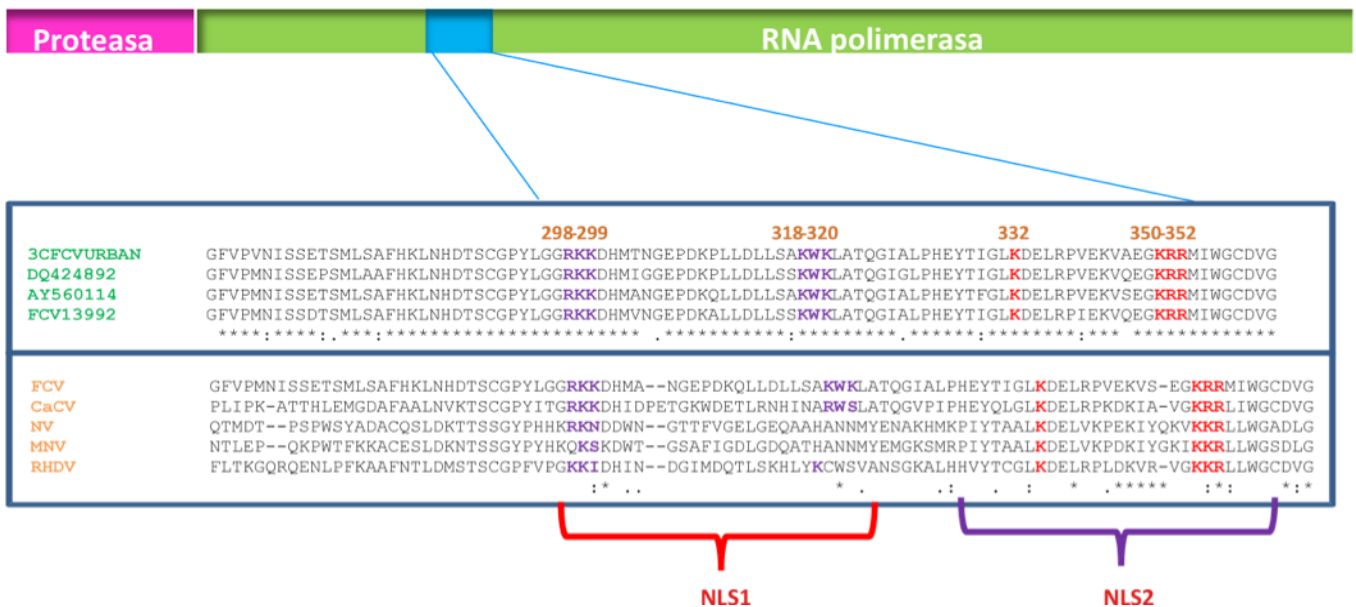


**Figura 12. Colocalización de la proteína 3CD o NS6/NS7 con DAPI.** Células infectadas a una MOI de 2 (A) y a una MOI de 10 (B) fueron teñidas a las 2, 4 y 6 hpi para la detección de la proteína viral 3CD, en rojo (Alexa Fluor anti-Rabbit) 594 . Los núcleos se teñieron con DAPI. (Azul). Las señales en blanco indican la colocalización entre 3CD o NS6/NS7 y el DAPI.

Como controles del experimento, se incluyeron células sin infectar, y teñidas únicamente con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594, y en ningún caso se detectó la señal en rojo (datos no mostrados).

# DETERMINACIÓN DE UNA POSIBLE SECUENCIA DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR EN LA PROTEÍNA 3CD o NS6/NS7 DEL CALICIVIRUS FELINO

Dado que los ensayos de inmunofluorescencia indicaron que la 3CD o NS6/NS7 se localizaba parcialmente en el núcleo, resultaba interesante determinar cuál podría ser el mecanismo por medio del cual lo lograba. Una posibilidad era que presentara secuencias de localización nuclear (NLS), por lo que inicialmente se realizó un análisis *in silico* utilizando el programa Virus-Ploc para determinar en la secuencia de la proteína 3CD o NS6/NS7 del FCV. El programa arrojó dos posibles secuencias de NLS bipartitas, (Figura 13). Así mismo encontramos que estas señales putativas se encuentran conservadas entre diferentes miembros de la familia *Caliciviridae* (Figura 13).

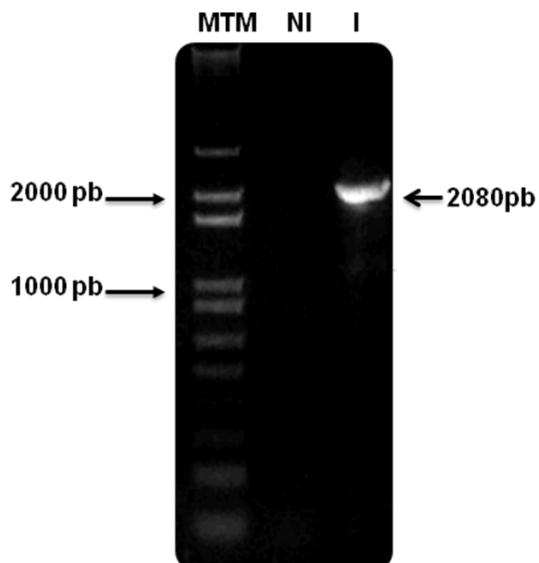


**Figura 13. Alineamiento de la secuencia de la proteasa polimerasa 3CD o NS6/NS7de FCV con otros miembros de la familia.** Dos trectos cortos que contienen aminoácidos básicos con residuos 291-356 de la proteasa-polimerasa 3CD o NS6/NS7de FCV se encuentran conservados en los miembros de la familia *Caliciviridae*.

## **CLONACIÓN DE LA 3CD o NS6/NS7 EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN 4EGFP**

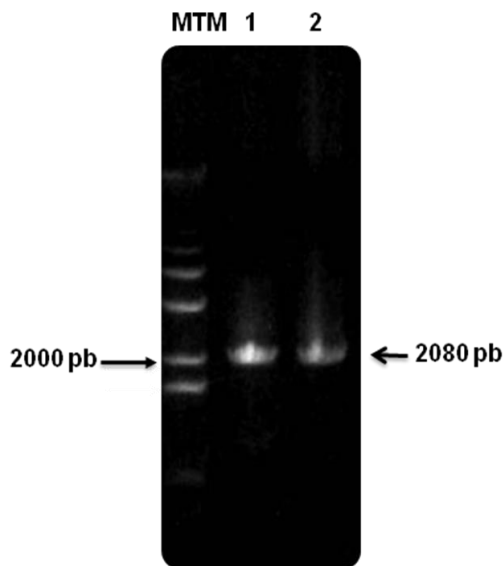
La presencia de la NLS's sugirió fuertemente que la proteasa-polimerasa 3CD o NS6/NS7 podría usarlas para translocarse al núcleo por lo que con la finalidad de determinar si esta tenía dicha capacidad de traslocarse por sí misma o requería de un contexto de células infectadas, se procedió a clonar y expresar a la proteína 3CD o NS6/NS7 fusionada a la proteína 4GFP, como se describió en la sección de materiales y métodos.

El gene de la proteasa- polmerasa 3CD, de 2080 pb, se amplificó por RT-PCR a partir de extractos de RNA de células infectadas (Figura 14).



**Figura 14. Amplificación del gen de la 3CD o NS6/NS7 por RT-PCR.** El gen de la 3CD o NS6/NS7 fue amplificado utilizando los oligonucleótidos 5' 3CDHindIII y 3'3CD EcoR1. El producto de la reacción fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. MTM: marcador de tamaño molecular, NI: reacción de RT-PCR a partir de células no infectadas e I: producto amplificado de 2080 pb (3CD) a partir de células infectadas.

Una vez obtenido el fragmento de 2080 pb, se clonó directamente en el vector pCRII TOPO y al transformar células competentes se obtuvieron dos colonias candidatas que se analizaron por PCR utilizando los oligonucleótidos que amplifican al gen de la 3CD, como se observa en la figura 15.

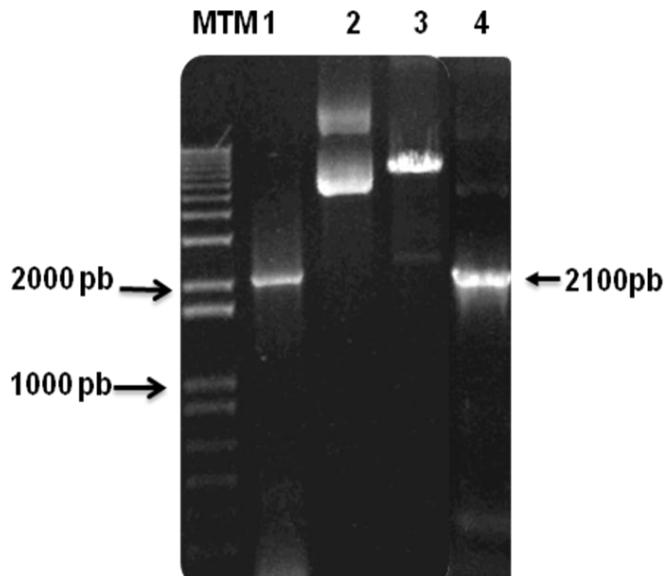


**Figura 15. Análisis de las colonias transformadas con el producto de la ligación del gen 3CD o NS6/NS7 en el vector pCRII TOPO por PCR.** El DNA de las colonias fue sometido a amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos para el gen que codifica a la proteína 3CD o NS6/NS7. MTM: Marcador de Tamaño Molecular, carriles: 1 y 2.- colonias candidatas.

## **B) SUBCLONACIÓN DEL GEN DE LA 3CD o NS6/NS7 EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN 4EGFP.**

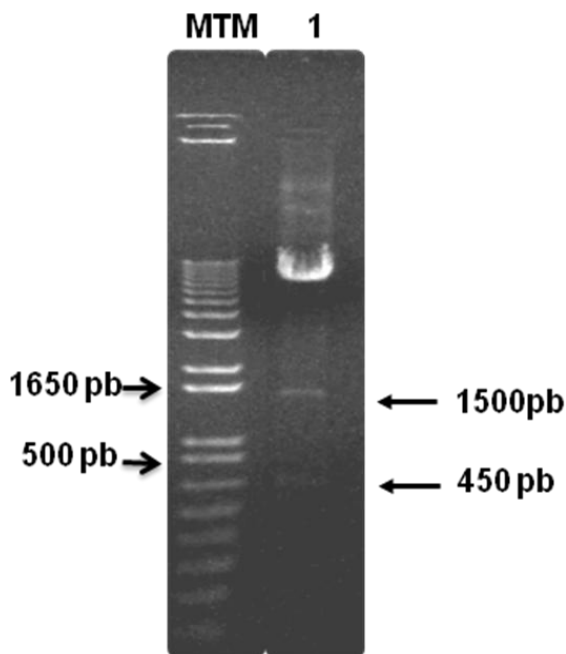
Una vez obtenido el gen de la 3CD o NS6/NS7 se escindió del vector de transito para clonarlo en el vector 4EGFP (el plásmido EGFP-N3 fue donado amablemente por el Dr. Christian Beetz). Ambos plásmidos 4GFP y TOPO3CD o NS6/NS7 fueron sometidos a una doble restricción con las enzimas HindIII y EcoR1 y posteriormente el gene de 3CD o NS6/NS7 fue clonado de manera dirigida en el

vector de expresión (Figura 16). Como se puede observar liberó un inserto de 2080 pb cuando fue sometida a una restricción con las enzimas HindIII y EcoR1, (carril 4), corroborando así que la 3CD o NS6/NS7 está clonada en el vector 4EGFP.



**Figura 16. Análisis de la colonia con el producto del gen 3CD o NS6/NS7 en el vector 4EGFP.** Marcador de tamaño molecular (MTM), el DNA del plásmido 4EGFP-3CD o NS6/NS7 sin cortar (carril 2) o cortado con las enzimas de restricción HindIII y EcoR1 (carril 3) Reacción de PCR para la amplificación del gen 3CD o NS6/NS7a partir del plásmido 4GFP3CD (carril 4) y control positivo del gen que codifica para la 3CD (carril 1).

Con la finalidad de analizar si la 3CD o NS6/NS7 se encontraba sentido se procedió a realizar una restricción enzimática utilizando las enzimas XhoI y XbaI, las cuales tienen un solo sitio de corte en las secuencias de la 4GFP y la enzima y de la 3CD respectivamente, por lo tanto si el fragmento se encontraba en sentido se esperaban dos fragmentos liberados uno de uno de 1500 pb y otro de 450 pb. Como se observa en la Figura 17 la colonia candidata presenta el patrón de bandas esperadas para una ligación del inserto de 5´ a 3´. Estos resultados nos sugirieron que el fragmento estaba en fase.



**Figura 17. Análisis de la colonia candidata para determinar su orientación.** El DNA fue sometido a doble restricción con las enzimas HindIII y EcoR1 y analizado en un gel de agarosa al 2%. Carriles marcador de peso molecular y carril 1.- colonia candidata cortada enzimáticamente.

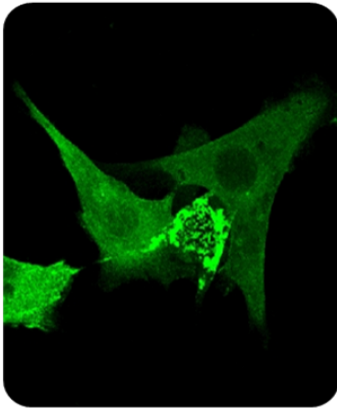
### EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 3CD o NS6/NS7 EN CÉLULAS CrFK TRANSFECTADAS CON EL PLÁSMIDO 4GFP3CD

Una vez confirmado que contábamos con el plásmido 4GFP-3CD o NS6/NS7 adecuadamente construido se procedió a transfectarlo en células CrFK y se analizó la localización subcelular de la 3CD-EGFP a las 24 h post transfección. Se incluyeron varios controles que se pueden apreciar en la figura 18A donde podemos observar la expresión de la 4EGFP se localiza principalmente en el citoplasma celular, a diferencia de la expresión de la 4EGFP fusionada a la secuencia de localización nuclear de SV40 (4EGFP-NLS), la cual se observa principalmente en el núcleo, como se esperaba (Figura 18 A).

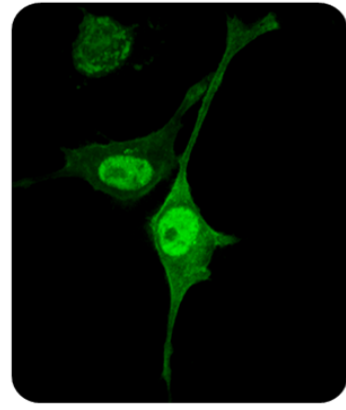
Para analizar si la localización subcelular de la 4EGFP-3CD o NS6/NS7 se modificaba en un contexto de células infectadas, las células se transfectaron con el plásmido 4EGFP-3CD o NS6/NS7 y posteriormente se infectaron a una MOI de 10 por 3h y 5h. La localización subcelular de la proteína 4EGFP-3CD o NS6/NS7 se observa en ambos tiempos localizada en el citoplasma celular (Figura 18B). De igual manera, cuando se transfectaron los plásmidos 4EGFP y 4EGFP-NLS, y se infectan las células, ambas proteínas se localizan en el citoplasma y núcleo celular respectivamente (Figura 18 B). Para analizar si la localización subcelular de estas proteínas se modificaba tras una super-infección experimentos semejantes se llevaron a cabo a una MOI de 100. Para analizar si la localización subcelular de la 4EGFP-3CD o NS6/NS7 se modificaba en un contexto de células infectadas, las células se transfectaron y como se observa en el citoplasma y núcleo celular a 3 y 5 hpi, mientras que la 4EGFP y 4EGFP-NLS permanecen en el citoplasma y el núcleo respectivamente. Estos datos nos sugieren que la 3CD o NS6/NS7 necesita una super-infección para poder ser translocada al núcleo.



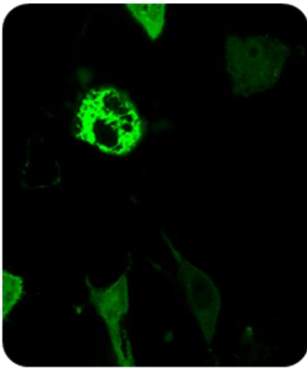
A)



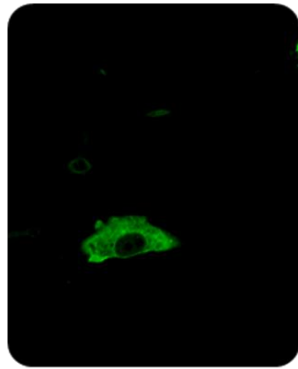
4EGFP NI



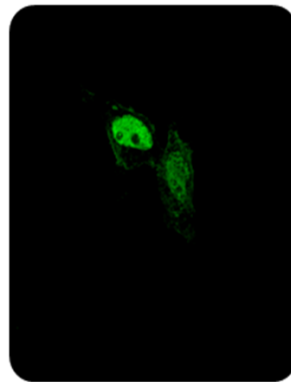
4EGFP-NLS NI



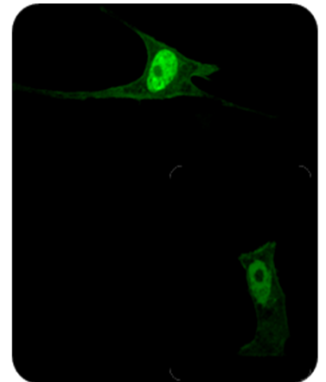
4EGFP INF 3h



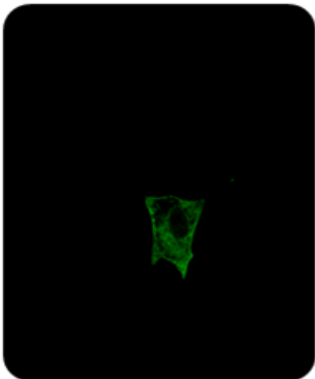
4EGFP INF 5h



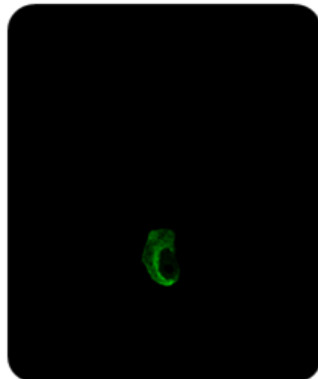
4EGFP-NLS INF 3h



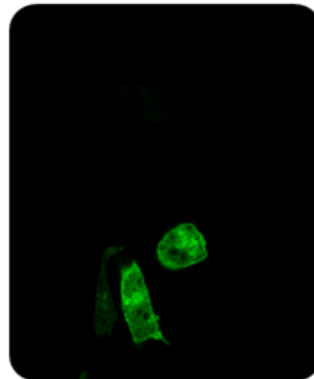
4EGFP-NLS INF 5h



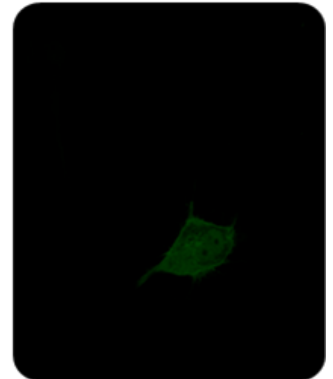
4EGFP-3CD NI 3h



4EGFP-3CD NI 5h

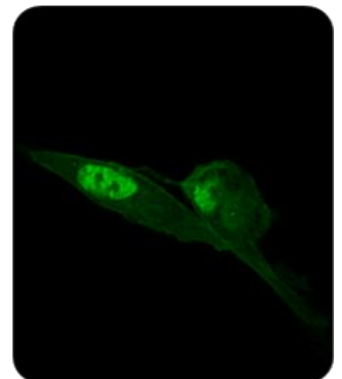
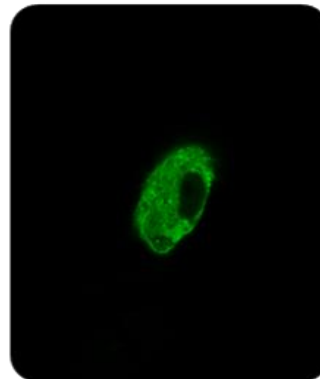
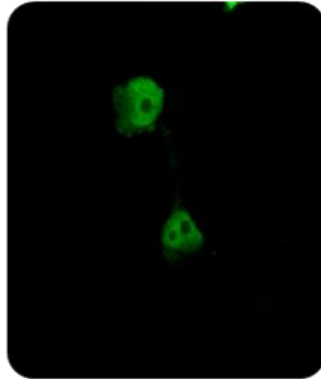
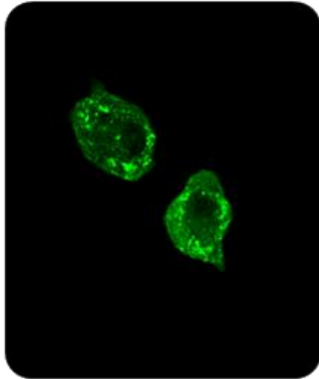
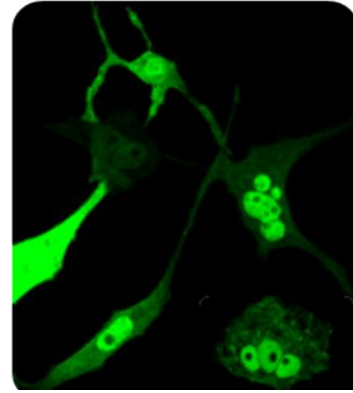
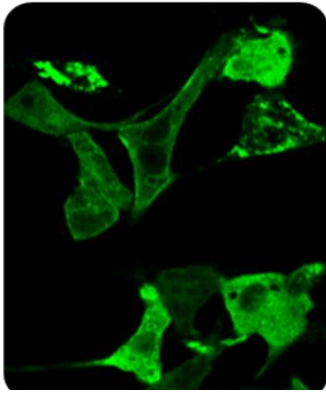


4EGFP-3CD INF 3h



4EGFP-3CD INF 5h

B)

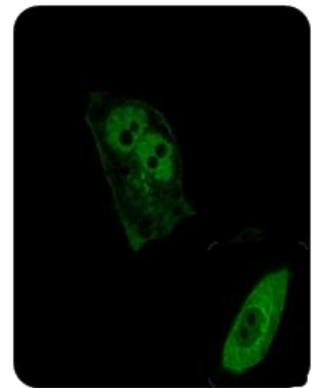
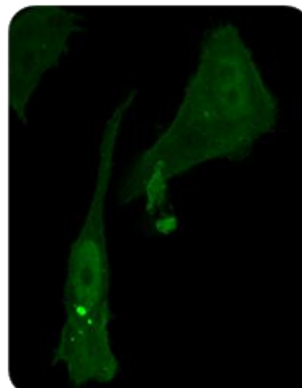
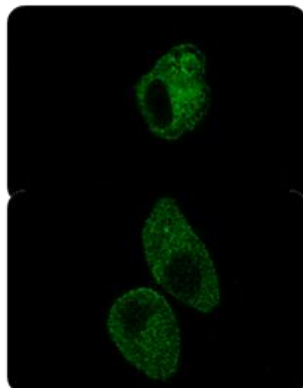
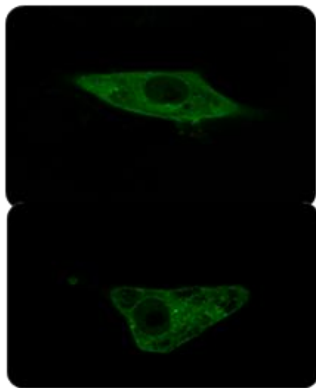


4EGFP INF 3h

4EGFP INF 5h

4EGFP-NLS INF 3h

4EGFP-NLS INF 5h



4EGFP-3CD NI 3h

4EGFP-3CD NI 5h

4EGFP-3CD INF 3h

4EGFP-3CD INF 5h

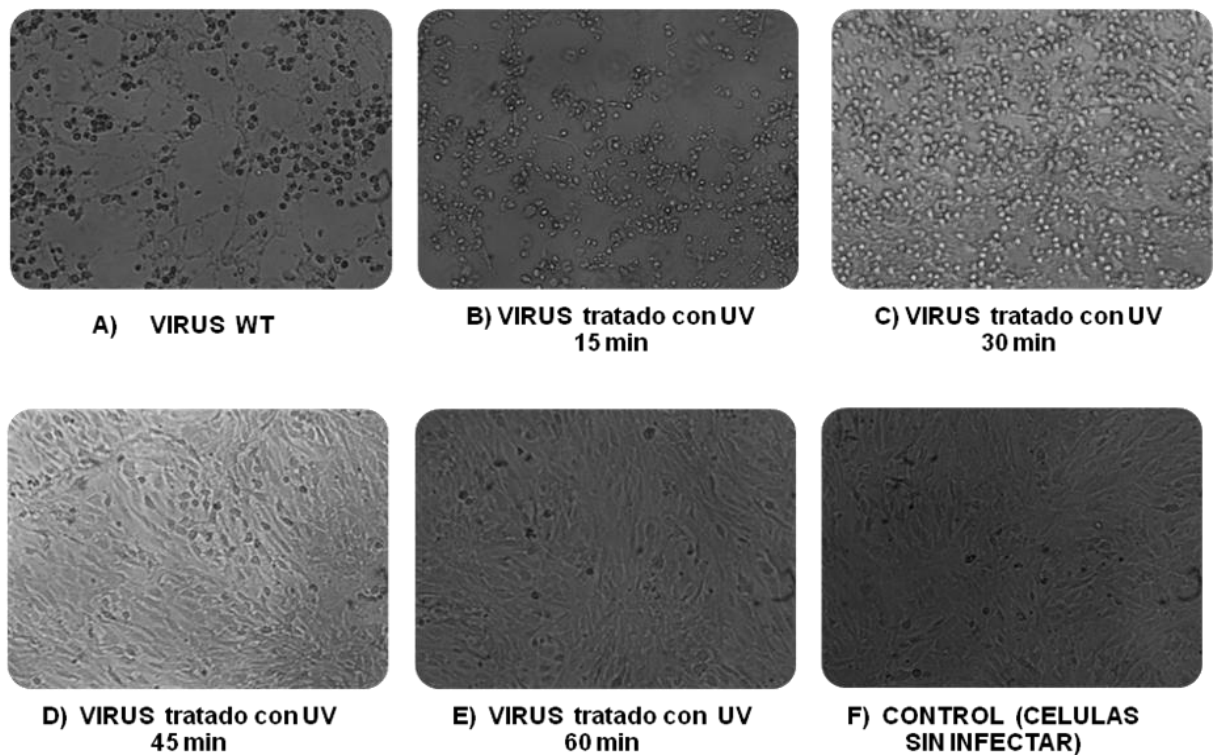
**Figura 18. Localización subcelular de las proteínas 4EGFP, 4EGFP-NLS y 4EGFP-3CD o NS6/NS7 en células no infectadas e infectadas con FCV.** A) Células CrFK fueron tranfectadas transitoriamente con los plásmidos 4EGFP, 4EGFP-NLS, y 4EGFP-3CD, por 24 h e infectadas (INF) con FCV a una MOI de 10 PFU/célula B) a una MOI. de 100 PFU/célula. (NI): células no infectadas.

## **ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA ANALIZAR LA POSIBLE INTERACCIÓN DE LA 3CD o NS6/NS7 CON NUCLEOLINA**

Otro de los aspectos que también nos interesó analizar es la participación de proteínas celulares en la infección por el FCV, ya que hasta el momento es muy poco lo que se sabe con respecto a la participación de proteínas relacionadas con el virus. El estudio de proteínas que participan en la replicación viral se ha basado en aquellas que aumentan o disminuyen su expresión, o que se relocalizan como producto de la infección viral. Para poder adjudicar algún cambio de las proteínas celulares como respuesta a la infección viral y distinguirlos de los cambios que ocurren como resultado de mecanismos de defensa celulares, era importante contar con virus inactivados como control de los ensayos de infección.

Para ello, monocapas de células CrFK fueron infectadas a una MOI de 0.5, posteriormente 48 horas después de la infección las células fueron recolectadas como se describió en la metodología, y los virus fueron inactivados con luz ultravioleta (UV) a diferentes tiempos. En la figura 19A podemos observar el efecto citopático producido por los virus silvestres. Este efecto se observa disminuido a medida que se infectaron las monocapas con virus tratados con luz UV a tiempos crecientes de exposición. (figura 19 B-E). Entre los 45 y 60 min de exposición con luz UV se observó que el

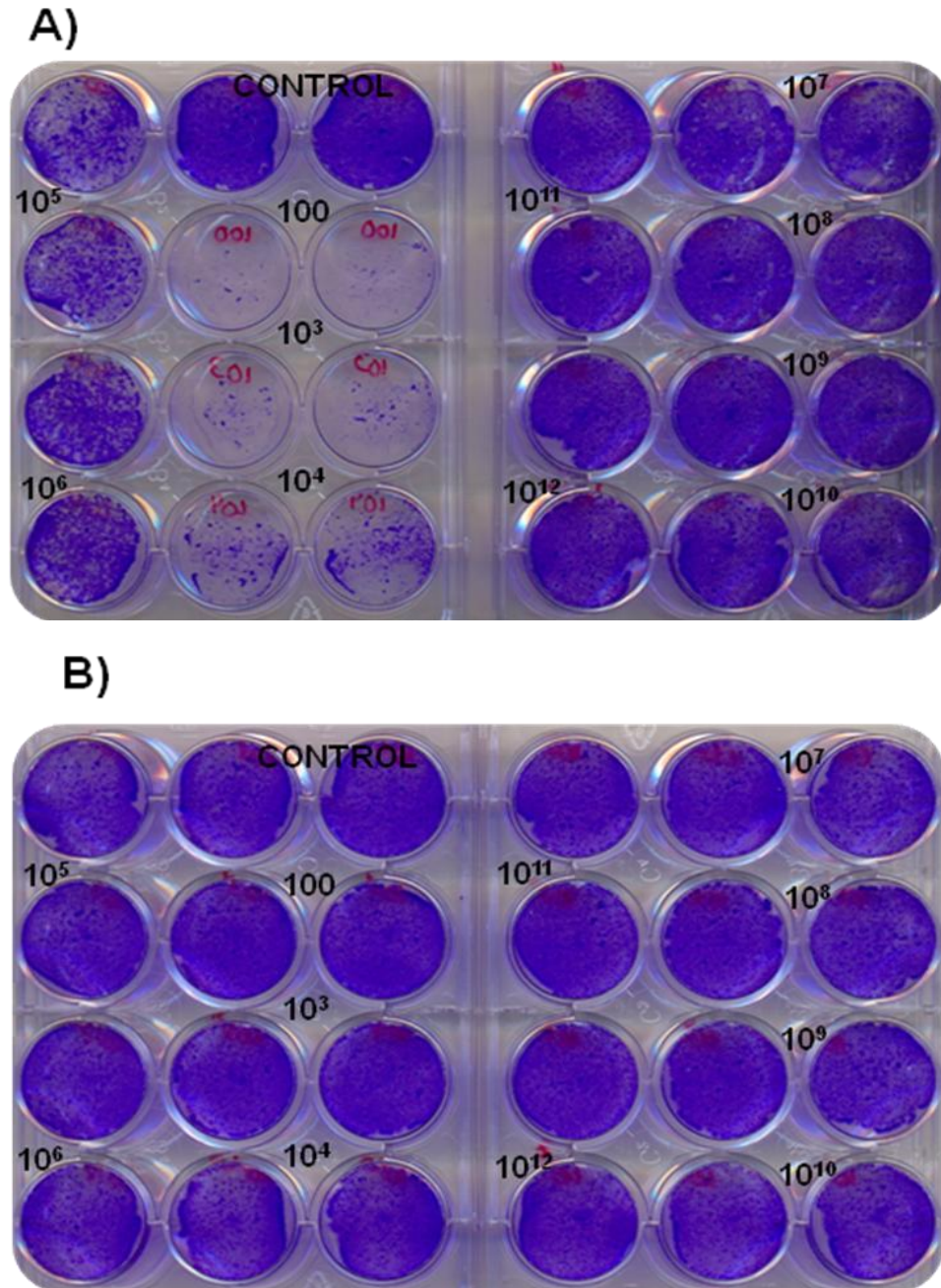
virus perdía su capacidad de infectar evidenciado por la pérdida del efecto citopático como se observa en la Figura 19D y E respectivamente, dado que las monocapas se observan no infectadas permanecieron sin cambios (Figura 19F)



**Figura 19. Cinética del virus inactivado por luz Ultravioleta (UV).** Monocapas de células CrFK fueron infectadas con el virus silvestre (A) o tratado con luz UV a 15 (B), 30 (C), 45 (D) y 60 min (E) Células sin infectar (F).

Una vez que se hubo determinado que el virus expuesto a luz UV durante 45 min no modificaba la morfología de la monocapa celular, se procedió a corroborar su inactivación del virus por ensayos de plaqueo. En la Figura 20A se puede observar el efecto citopático que producen los virus silvestres, mientras que el virus tratado con

luz UV por 45 min no produce ninguna placa viral (figura 20 B). Estos datos corroboraron la inactivación del virus con luz UV a partir de los 45 min de exposición.

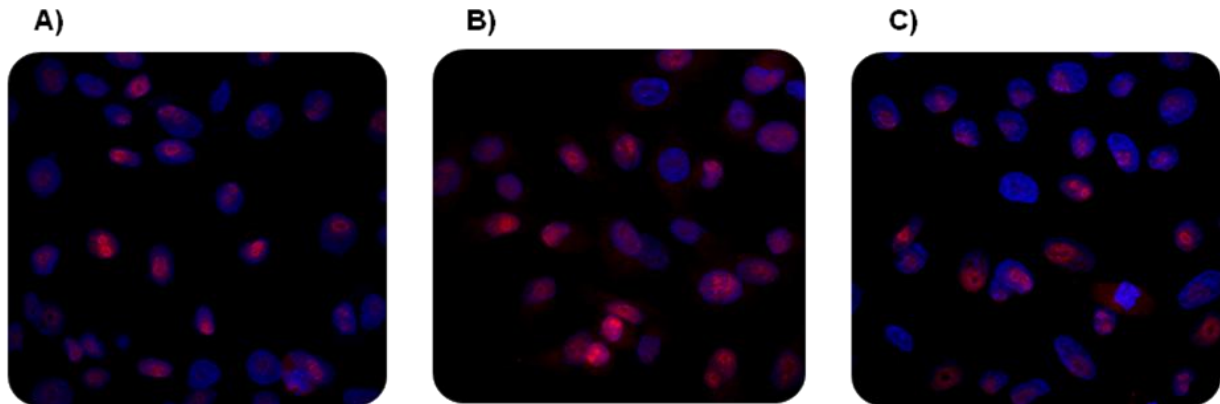


**Figura 20. Ensayo de plaqueo en células CrFK con el virus inactivado por luz UV durante 45 minutos y tinción con cristal violeta. A) ensayo de plaqueo con el virus silvestre. B) ensayo de plaqueo con el virus luz UV a partir de los 45 minutos.**

### **a) ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA CON EL VIRUS INACTIVADO EN CÉLULAS CrFK**

En el laboratorio se tenía el antecedente de que la nucleolina, una proteína multifuncional que se localiza principalmente en los nucleolos, se unía a la RNT 3' del RNA genómico del FCV. Así mismo se determinó que esta proteína se relocaliza de los nucleolos al nucleoplasma como consecuencia de la infección viral. Dado que la replicación del RNA viral comienza en la RNT 3', en la cual se asocia la polimerasa viral 3CD, y a que se sabe que estos complejos del inicio de la replicación del RNA están formando por proteínas virales y celulares adosados a membranas perinucleares, nos planteamos la posibilidad de que la nucleolina podría estar formando parte de este complejo de inicio de la repliación del RNA.

En la figura 21A se observan células sin infectar y una señal en rojo correspondiente a la nucleolina sólo en los nucléolos como se esperaba. En la figura 21B se observan células infectadas con el virus silvestre a una MOI de 10 a las 5 horas post-infección y se puede apreciar una señal en rojo tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células indicando que el virus está modificando la localización del nucleolina, lo cual no se observa en el ensayo que se realiza con el virus previamente inactivado con la luz UV (Figura 21C) en donde la señal se aprecia solamente en los nucléolos tal como en las células sin infectar. Estos resultados nos indicaron que el virus inactivado no modifica la localización de la proteína nucleolina, es decir, esta necesita una infección activa para que este proceso se lleve a cabo.



**Figura 21. Ensayo de inmunofluorescencia con el virus inactivado en células CrFK.**  
 A) células CrFK sin infectar. B) células CrFK infectadas 5 horas a una MOI de 10 y c) células CrFK infectadas a 5 horas con el virus inactivado. Se observa en rojo a la proteína nucleolina.

**ENSAYO DE COLOCALIZACIÓN DE NUCLEOLINA CON LA 3CD o NS6/NS7 EN ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA EN CÉLULAS CrFK.**

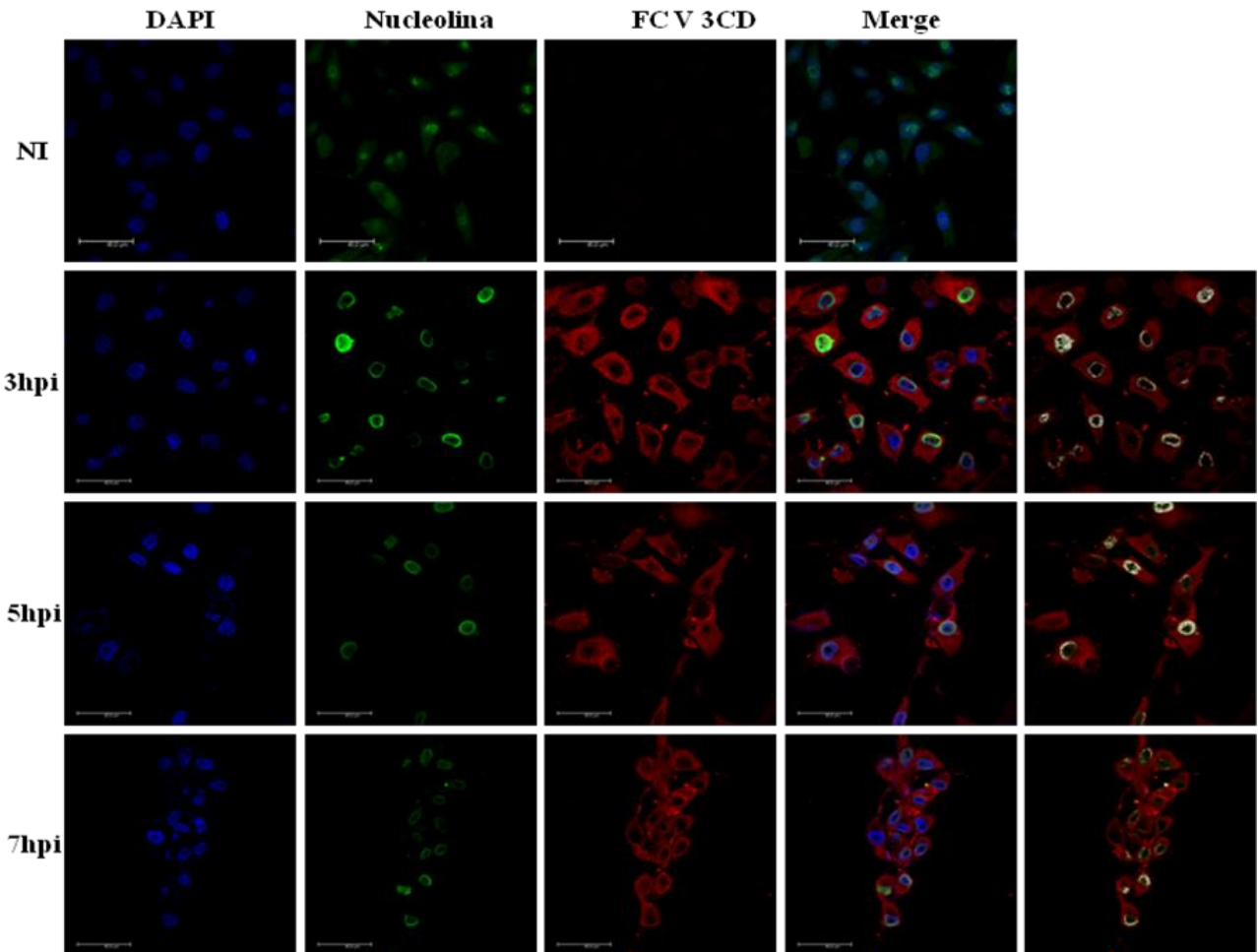
Con la finalidad de analizar si la 3CD o NS6/NS7 colocalizaba con nucleolina se infectaron células CrFK a una MOI de 10 y a las 3, 5 y 7 hpi se procesaron para su análisis por inmunofluorescencia. El marcaje en verde (marcada con Alexa Fluor 488) corresponde a la proteína nucleolina y en rojo (Alexa fluor 594) a la proteasa-polimerasa viral 3CD o NS6/NS7. Como se había descrito anteriormente, la nucleolina se observa con una localización principalmente nucleolar en las células no infectadas (Figura 22, NI), y a medida que transcurre la infección, ésta comienza a localizarse en el nucleoplasma celular (figura 22, 3 hpi). y de forma perinuclear a las

5 y 7 hpi (figura 22, 5 hpi y 7 hpi). La localización de la proteína en células infectadas a diferentes tiempos muestra que esta se localiza en el citoplasma de las células desde las 3 hpi y hasta las 7 hpi como se había descrito anteriormente. Cuando se hizo el análisis de la sobreposición de ambos fluoróforos, se determinó que la proteasa-polimerasa 3CD o NS6/NS7 y nucleolina colocalizan de forma perinuclear, a partir de las 3 hpi, siendo esta marca más evidente a las 5 y 7 hpi (Figura 22 imágenes merge). La colocalización se confirmó utilizando el Software de LAS AF lite donde se observa la tinción amarilla, que enfatiza la co-localización entre ambas proteínas de manera perinuclear. Estos datos sugieren que nucleolina esta co-localizando de alguna forma con la 3CD o NS6/NS7 de FCV.

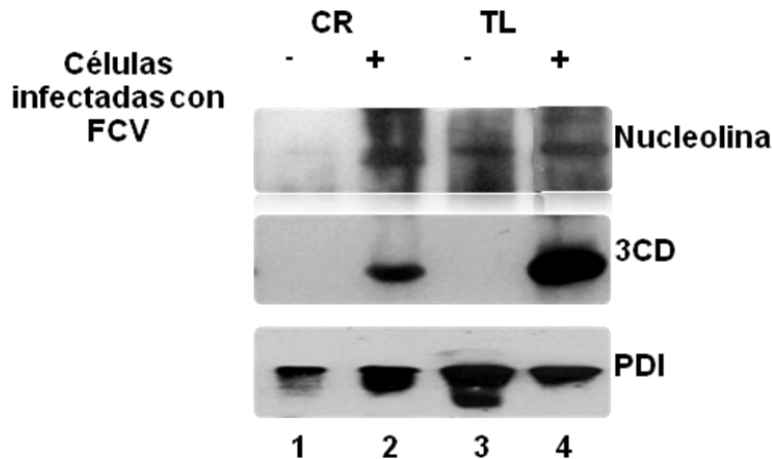
La asociación de la nucleolina con la proteasa-polimerasa 3CD o NS6/NS7, sugería la participación de la nucleolina en la replicación, por lo cual era importante determinar si esta se encontraba presente en los complejos replicativos virales. Para ello, se realizó un fraccionamiento celular, en donde se separaron distintas fracciones citosólicas o membranosas. Aquellas que en la literatura se ha descrito que retienen la actividad replicativa se denominan complejos replicativos (CR). El fraccionamiento celular a partir de extractos totales de células infectadas muestra que la nucleolina solo se detecta en extractos totales y en CR provenientes de células infectadas, y no así en las fracciones equivalentes de células no infectadas (Figura 23). La presencia de la proteína PDI, que es un marcador de retículo endoplásmico, en los CR de células no infectadas e infectadas, demuestra que el fraccionamiento se realizó de manera adecuada. Estos resultados sugieren que nucleolina se encuentra en los



complejos replicativos de células infectadas con FCV y que probablemente juegue un papel importante en la replicación del virus.



**Figura 22. Colocalización de nucleolina y 3CD o NS6/NS7o NS6/NS7 durante la infección por FCV.** A) monocapa de células CrFK no infectadas o infectadas con FCV por 3, 5 y 7 horas a una MOI de 10 fueron fijadas y teñidas para 3CD o NS6/NS7 en rojo y nucleolina en verde y los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las células fueron observadas utilizando microscopia confocal. Las imágenes sobrelapadas de nucelolina y 3CD o NS6/NS7 de FCV la co-localización de 3CD o NS6/NS7 y nucleolina en amarillo a 3, 5 y 7 horas post infección se muestra en las imágenes de la derecha.



**Figura 23. Presencia de la proteína nucleolina en Complejos replicativos (CR).** Proteínas asociadas con extractos totales o con complejos replicativos fueron obtenidos a partir de células infectadas. La presencia de Nucleolina, 3CD o NS6/NS7 de FCV y PDI como un marcador de retículo endoplasmico fue evaluada por WB.

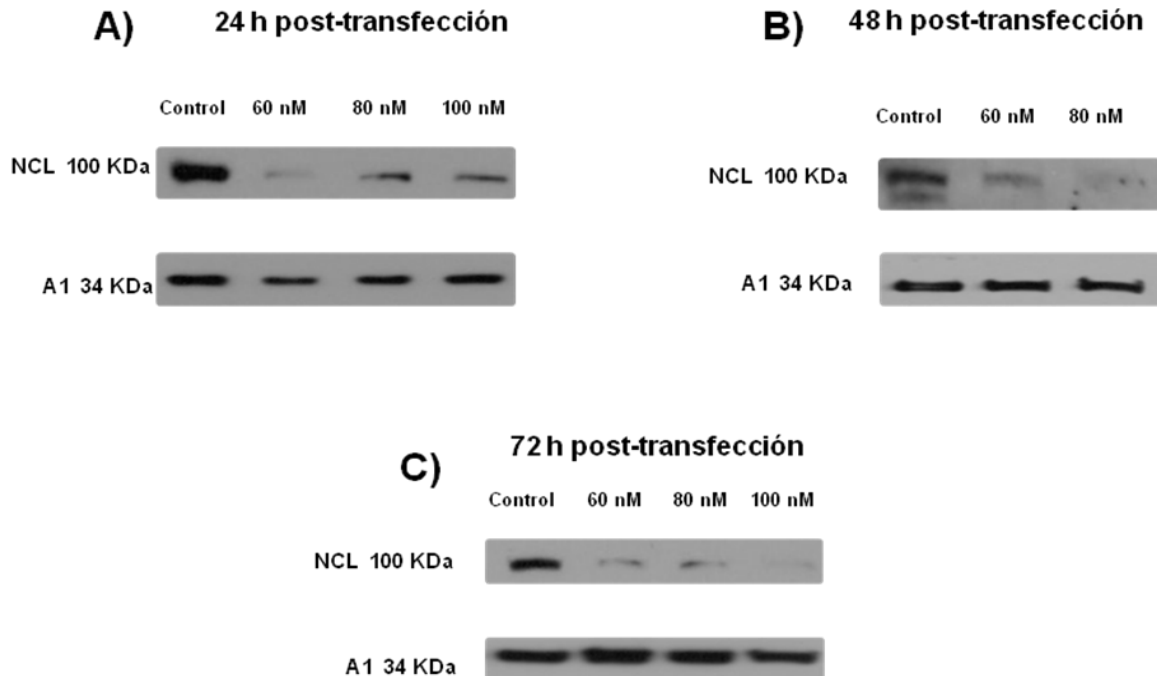
## ENSAYOS DE SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEINA NUCLEOLINA SOBRE CÉLULAS CrFK TRANSFECTADAS

Para determinar el probable papel funcional de la proteína nucleolina tenía un papel funcional en la replicación del FCV, se realizaron ensayos de infección en células en las que se inhibió la síntesis de nucleolina, mediante ensayos de silenciamiento con siRNAs.

Los RNAs interferentes para nucleolina se diseñaron como se describió en la sección de materiales y métodos. y para determinar las mejores condiciones para el silenciamiento de la proteína nucleolina, se transfectaron monocapas de células CrFK con diferentes concentraciones del siRNA a diferentes tiempos y se evaluó este mediante ensayos de tipo WB.

En la figura 24A se muestra un ensayo de silenciamiento por 24 horas, con 60, 80 y 100 nM de siRNAs, y como se puede observar con respecto al control de células no transfectadas, la expresión de nucleolina se ve reducida en las tres concentraciones. Como control de carga de los experimentos se utilizó un anticuerpo que reconoce a la proteína A1. El silenciamiento de la nucleolina se sigue observando a las 48 hrs post-transfección (Figura 24B), y hasta las las 72 horas (figura 24C).

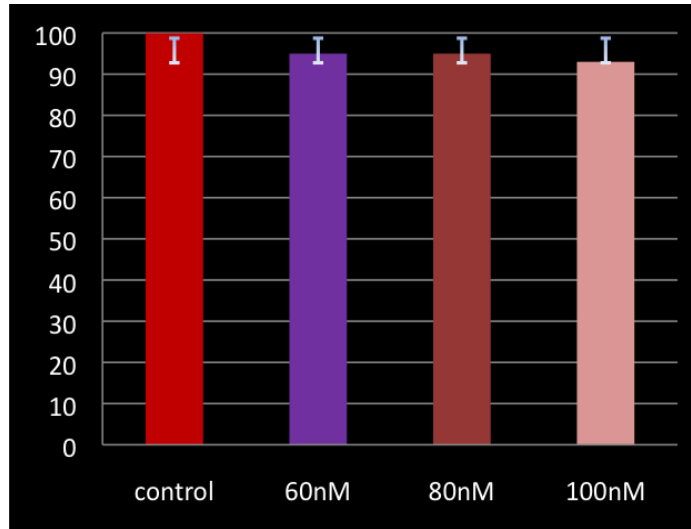
Dado que la mayor reducción de la expresión de la nucleolina se observó a las 48 hrs, con una concentración de 80 nM, se decidió utilizar estas condiciones para los siguientes experimentos.



**Figura 24. Evaluación del silenciamiento de la nucleolina en células CrFK por WB.** Monocapas de células CrFK fueron transfectadas a diferentes tiempos y diferentes concentraciones de siRNAs y como control de carga se utilizó a la proteína A1 de 34 KDa. A) 24 hrs post-transfección no se observa claramente una disminución de nucleolina. B) 48 hrs post-transfección se observa claramente una disminución de nucleolina a la concentración de 80 nM y C) 72 hrs post-transfección se observa claramente una disminución de nucleolina a una concentración de 60 nM.

Dado que la nucleolina es una proteína involucrada en múltiples funciones muy importantes para la célula, se realizó un ensayo de viabilidad de las células transfectadas con siRNAs de nucleolina con la finalidad de corroborar que el silenciamiento de la proteína no afectara su crecimiento.

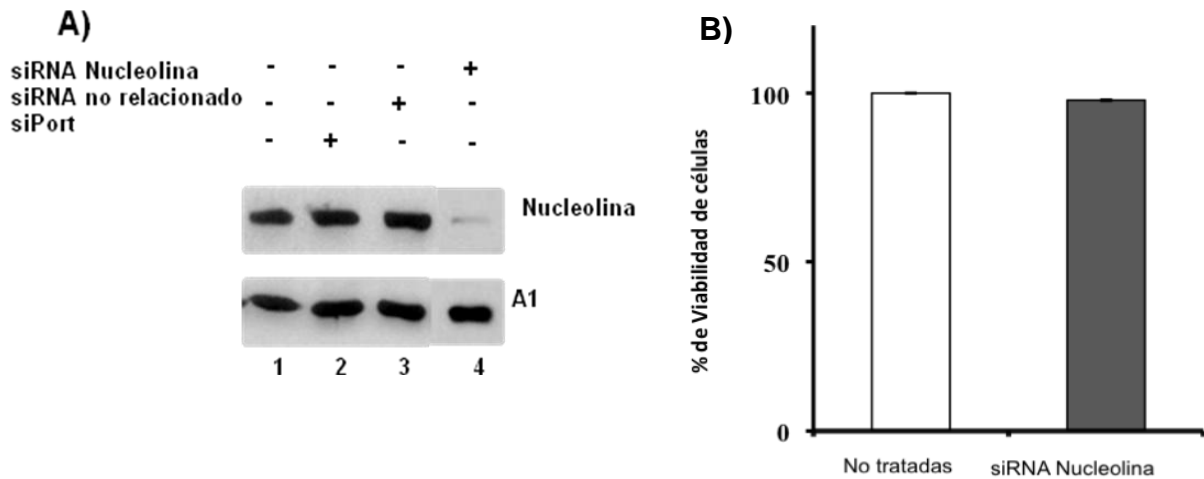
Monocapas de células CrFKs crecidas en placas de 96 pozos fueron transfectadas con 80 mM de siRNAs de nucleolina, y analizadas 8 hrs después de la transfección con el Kit Cell Titer 96 (promega) a una absorbancia de 590 nm en un lector Biotek. Como se puede observar en la Figura 25 las células tienen un porcentaje de viabilidad mayor al 80% por lo que el silenciamiento de nucleolina en las condiciones empleadas no afecta la viabilidad celular.



**Figura 25. Porcentaje de viabilidad de células CrFK transfectadas con siRNAs de nucleolina.** Monocapas de células CrFK fueron transfectadas con el siRNA de nucleolina a diferentes concentraciones y el porcentaje de viabilidad fue evaluado mediante el uso del kit Cell Titer 96 (promega) a una absorbancia de 590 nm en un lector Biotek.

De manera paralela, se montaron las condiciones para el uso de un siRNA no relacionado, con la finalidad de utilizarse como control de los posteriores ensayos de infección en células interferidas con los siRNAs para nucleolina. En la figura 26A se analizó la expresión de nucleolina en células no transfectadas, tratadas con el medio de transfección (siPORT) y transfectadas con los siRNAs no relacionados, en donde se detectan cantidades equivalentes de la proteína nucleolina mediante un WB. De igual manera se determinó que la expresión de la nucleolina se encuentra reducida en las células interferidas con el siRNA específico, en un 85% aproximadamente. Nuevamente se utilizó a la proteína A1 como control de carga. Por otro lado en la

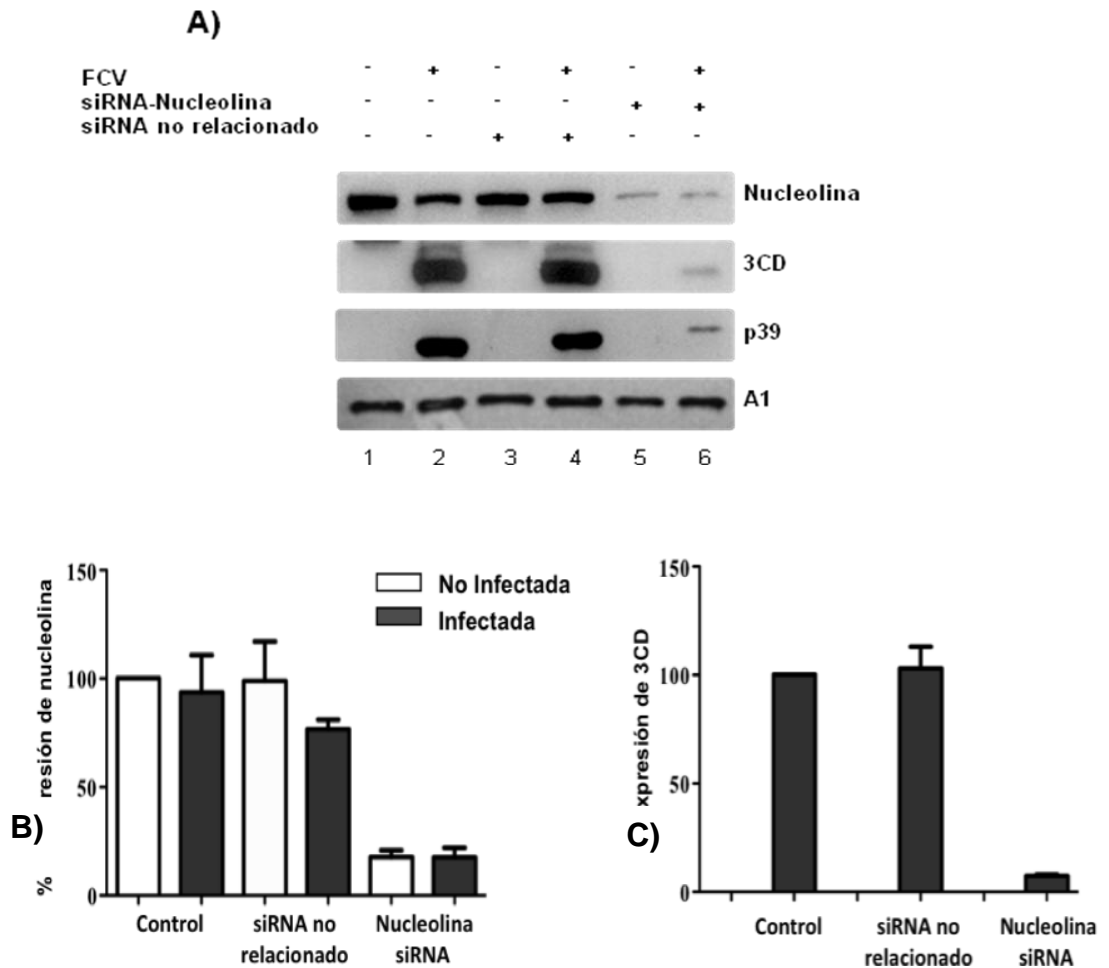
Figura 26B se muestra el ensayo de viabilidad con el siRNA específico de nucleolina del 90% a las 48 hrs.



**Figura 26. Efecto del silenciamiento de nucleolina y siRNA no relacionado utilizando células CrFK.** A) Ensayo de WB carril 1.- células CrFK fueron no tratadas, carril 2.- células tratadas con el agente siPORT, carril 3.- células transfectada con el siRNA no relacionado y carril 4.- células transfectadas con el siRNA específico para nucleolina de FCV. Como control de carga se usó a la proteína A1. B) Ensayo de viabilidad a las 48 hrs de transfección con el siRNA específico de nucleolina.

Una vez establecidas las condiciones de transfección de los siRNAs, y corroborado que a expresión de la nucleolina se abate a las 48 hrs, las células se infectaron a una MOI de 10 y a las 6 hpi se determinó la expresión de proteínas viales. En la figura 27A por ensayo de WB se observó que la expresión de las proteína virales 3CD o NS6/NS7, p39 (NS3) en células no tratadas y tratadas con el siRNA e infectadas, permanece constante, mientras que cuando se transfecta con los siRNAs específicos para nucleolina, y se infectan las células, se detectó una

reducción en la expresión de la nucleolina de un 75%, y de un 90% de las proteínas virales 3CD o NS6/NS7 y p39 (Figura 27C). Como control de carga se utilizó a la proteína A1. Estos datos sugieren que nucleolina juega un papel importante en la expresión de algunas proteínas virales no estructurales del FCV y posiblemente en la replicación viral.

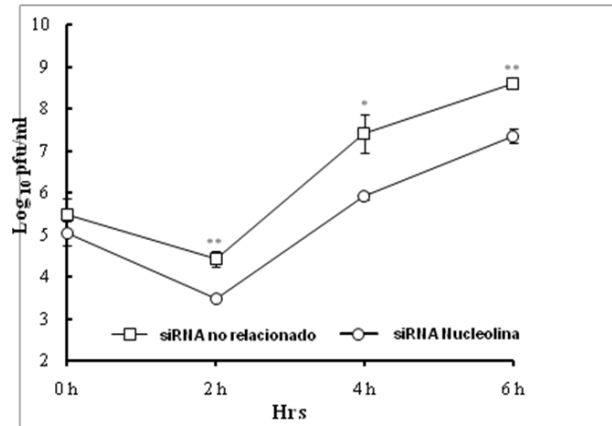


**Figura 27. Efecto de la expresión de la proteína Viral 3CD de FCV tras el silenciamiento de nucleolina.** A) Células CrFK no tratadas (carril 1 y 2) transfectadas con el siRNA no relacionado (carriles 3 y 4), transfectadas con el siRNA específico para nucleolina (carriles 5 y 6) a las 48 horas, posteriormente las células fueron infectadas a una MOI de 10 por 5 horas y se analizaron los niveles de expresión por ensayo de WB a las proteínas nucleolina, 3CD, p39 de FCV y como control de carga la proteína A1. Células no infectadas (carriles 1, 3 y 5), células infectadas (carriles 2,4 y 6). B y C) Nucleolina y 3CD cuantificadas por densitometría analizando la intensidad de banda usando el software Quantity-One

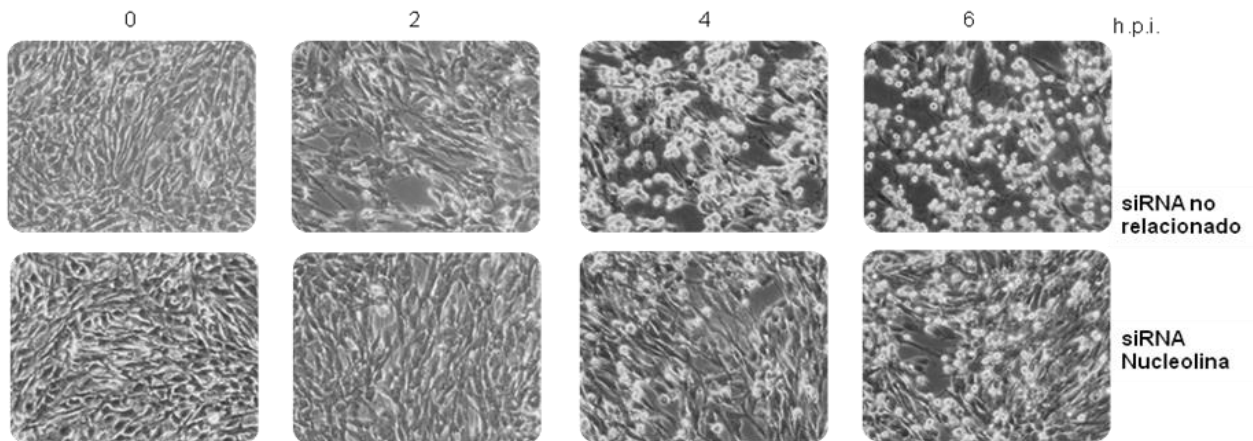
Finalmente para determinar si la nucleolina era requerida para la replicación del FCV, se realizaron ensayos de interferencia con los siRNAs para nucleolina y el no relacionados y se evaluó la producción viral a diferentes tiempos de infección (Figura 28). En estos ensayos se observó que el título viral por ensayo de plaqueo disminuye significativamente conforme transcurrió la infección. Estos datos fueron corroborados mediante un análisis de ANOVA de una vía, el cual mostró una disminución de 1.5 log de las células transfectadas con el siRNA específico para nucleolina a partir de las 4 y 6 horas. Así mismo, se observó un retardamiento del efecto citopático en las células transfectadas con el siRNA de nucleolina en comparación con el siRNA no relacionado, lo que indica que la nucleolina es requerida para una infección eficiente (figura 28B).



A



B



**Figura 28. La replicación del FCV es inhibida por el siRNA de Nucleolina.** A)

Análisis en una curva de crecimiento en una etapa del FCV, en células CrFK tratadas con el siRNA específico para nucleolina o un siRNA no relacionado. Las células CrFK tratadas con los siRNAs fueron infectadas con FCV a una MOI de 10 y el rendimiento del virus fue determinado a 0, 2, 4 y 6 horas post-infección mediante ensayos de plaqueo. Las infecciones fueron realizadas por duplicado y las barras de error representan una desviación estándar \* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.001$  mediante ANOVA de una vía. B) Microscopía por contraste de fases de células infectadas con FCV y transfectadas con los siRNAs contra nucleolina o no relacionado. Se observa retrasado y reducción del efecto citopático en células tratadas con el siRNA de nucleolina.

## **DISCUSIÓN**

En la actualidad existe una gran variedad de virus que afectan al ser humano, entre ellos son de gran importancia los que causan gastroenteritis, como los calicivirus. Es poco lo que se conoce acerca de su ciclo de replicación, por lo que se han diseñado estrategias para poder analizar los diferentes aspectos de su biología. Una herramienta importante para conocer a estos virus es la generación de anticuerpos en contra de las proteínas virales estructurales, ya que en general son los que se relacionan con la entrada del virus y con la serotipificación. Sin embargo la generación de anticuerpos que se encuentran dirigidos contra las proteínas asociadas a la infección, nos permiten analizar los procesos encaminados al estudio de otros aspectos de su biología como la replicación, el ensamblaje y la traducción. Durante este proyecto se demostró que la inmunización con péptidos de regiones conservadas de la proteasa-polimerasa viral, permitió la producción de anticuerpos específicos, los cuales constituyen una herramienta muy útil para el estudio no sólo de las proteínas virales contra las que están dirigidos sino de proteínas celulares asociadas que están implicadas en la replicación viral.

Mediante el uso de estos anticuerpos anti 3CD, pudimos determinar que esta proteína se encuentra mayoritariamente en el citoplasma celular, pero una proporción menor se transloca al núcleo a partir de las 4 horas post-infección. Como se observó en la figura 5. Este hallazgo fue confirmado por ensayos de inmunofluorescencia utilizando los mismos anticuerpos. La localización nuclear de la proteasa-polimerasa 3CD aunque discreta, ha sido recientemente descrita también por Hyde y cols.

Una vez analizado que la 3CD o NS6/NS7 de FCV se encontraba en el núcleo tras la infección nos hicimos la pregunta de cómo es que llega a este compartimiento celular. Se sabe que la proteasa-polimerasa del Rhinovirus humano y de Polivirus tienen una secuencia de localización nuclear (NLS) clásica que hace que éstas sean traslocadas al núcleo de la célula (Amineva 2004, y Rakhi 2004) y analizando que las proteasas polimerasas de estos dos virus son muy parecidas a la 3CD del FCV, nos preguntamos si la 3CD o NS6/NS7 de FCV tendría una NLS responsable de la presencia de esta proteína en el núcleo. Por esta razón, realizamos un ensayo *in silico* de la posible presencia de una NSL en la secuencia de la proteasa polimerasa 3CD o NS6/NS7 del FCV, la cual nos arrojó que hay dos posibles NLS bipartitas, no clásicas, a diferencia de las encontradas en las de las proteasas polimerasas de Rhinovirus humano y Polivirus son NLS monopartitas. Pero semejante a las presentes en la proteína NS5 del virus Dengue y que son , responsable de su localización en el núcleo de las células infectadas (Melinda J. 2007). El análisis de la secuencia de las dos NSL putativas bipartitas, en otros miembros de la familia *Caliciviridae*, nos permitió determinar que estas se encuentran muy conservadas y que por lo tanto deben tener un papel relevante en la función.

Utilizando el programa Virus-Ploc, el cual permite determinar la localización subcelular putativa de proteínas virales, se hizo la predicción de que esta proteína podría estar presente en el núcleo celular, y al cambiar los aminoácidos básicos (K) presentes en las NSLs putativas (Hong-Bin Shen. 2006), por Alanina, la nueva predicción fue que la 3CD se encontraría en la membrana de la célula sugiriendo fuertemente la importancia de los residuos de lisina de la NLS..

Estos resultados obtenidos *in silico* así como la evidencia experimental de que la proteasa polimerasa 3CD o NS6/NS7 se detectaba en extractos nucleares y citoplásmicos, decidimos comprobar este hecho en el contexto celular.

Para realizar estos experimentos, la secuencia del gene de la proteasa polimerasa 3CD o NS6/NS7 del FCV fue fusionada al de la proteína 4EGFP (donado por el Dr. Christian Beetz), el cual tiene las características de tener fusionado 4 copias de la secuencia que codifica para la proteína GFP esto con la finalidad de obtener una molécula de gran peso molecular incapaz de moverse por difusión al núcleo de la célula y que requiera por ende una secuencia de localización nuclear reconocida por la maquinaria del poro nuclear para el transporte,, como ocurre con la 4EGFP-NLS que contiene a la NLS monopartita clásica del virus SV40 (Christian Beetz, 2004) y que se usó como control (Figura ). De manera interesante al clonar y expresar a la proteína 4EGFP-3CD en células CrFK, se observó que esta no tenía la capacidad de trasladarse al núcleo celular, pese a la presencia de la secuencia NLS bipartita, por lo que era posible que no fuera funcional en células CrFK, sin embargo, en algunos reportes se ha descrito que la 3CD de Poliovirus, para trasladarse al núcleo, requiere además de una NLS, estar presente en un contexto de la infección viral. Esto podría deberse a que probablemente podrían activarse proteasas que le permitieran la exposición de una NLS para así poder ser reconocidas por las importinas, las cuales son las responsables de realizar el transporte del citoplasma al núcleo (Shunichi, 2008 y Allison 2007). Por esta razón, las células transfectadas con el plásmido 4EGFP-3CD o NS6/NS7 se infectaron con el FCV a una MOI de 10, sin embargo tampoco observamos una translocación de esta proteína al núcleo celular. Sin embargo usando

los ensayos se realizaron a una MOI de 100, como se ha reportado para otros virus, se observa en algunas células la localización de la proteína 4EGFP-3CD o NS6/NS7 en el núcleo pero en muy pocas las células.

Los ensayos de inmunofluorescencia mostraron que la localización subcelular de la proteasa polimerasa 3CD o NS6/NS7 del FCV es principalmente citoplásmica y perinuclear, aunque también se observan en el núcleo. Sin embargo, los ensayos de WB mostraron una proporción semejante de proteasa polimerasa 3CD o NS6/NS7 en extractos citoplásmicos y nucleares. Este resultado puede deberse a el fraccionamiento celular no fue el más adecuado y podríamos tener una posible contaminación de los extractos nucleares con extractos citoplásmicos, sin embargo, en los controles realizados no observamos que esto hubiese ocurrido, por otra parte podría estar sucediendo que no todas las células estuvieran infectadas con la misma intensidad esto es, solo de forma parcial, y por este motivo no observamos cambios en los ensayos de WB.

Con estos resultados podemos concluir que la proteasa polimerasa se encuentra en el citoplasma y en cierta proporción en la región perinuclear y en mucha menor proporción en el nucleoplasma. Estos resultados concuerdan con los reportados por otros grupos, que observan cierta proporción de la proteasa polimerasa 3CD o NS6/NS7 del MNV en el núcleo celular (Hyde y cols, 2010).

Es bien sabido que la proteasa-polimerasa del FCV tiene una doble función, la cual consiste en procesar a la poliproteína viral y participar en la síntesis del RNA viral. En este sentido, la proteasa polimerasa 3CD o NS6/NS7 forma un complejo

ribonucleoprotéico con la RNT 3' y seguramente con otras proteínas virales y celulares. Antecedentes del laboratorio, han puesto de manifiesto que la proteína nucleolina, de localización mayoritariamente nucleolar, se asocia con la RNT 3' del FCV de tal manera que resultaba interesante determinar si esta proteína podría participar en la replicación viral.

La expresión y localización subcelular de proteínas celulares implicadas en la replicación viral son modificadas durante el curso de una infección viral. En este trabajo se determinó que los niveles y la integridad de la nucleolina no se alteraban durante la infección, sin embargo se observó una clara distribución de la nucleolina, del nucléolo al nucleoplasma, particularmente en la región perinuclear durante estados en los que ocurre activamente la replicación del FCV. Este tipo de relocalización de la nucleolina también se ha reportado que ocurre como resultado de varios estímulos relacionados con el estrés tal como la exposición a la radiación ionizante, choque térmico, choque oxidativo y campotpesinas así como también como consecuencia de una infección viral (Masiuk, M. 2008). Las proteínas de varios virus colocalizan con factores nucleares tales como nucleolina, B23 y Fibrilarina, resultando en una subsecuente relocalización que juegan un papel relevante en los procesos de replicación viral (Hiscox 2002 y 2007). Adenovirus (HADV y HCVA1) interactúan con factores nucleares tales como nucleolina (Bertrand 2010, Callé 2008, Lymberopoulos 2007 y Matthews, D. A. 2001.). Durante la infección por HCV1 la proteína viral UL24 es requerida para una eficiente replicación viral e inducen la dispersión de nucleolina. En células infectadas con Citomegalovirus humano hay un incremento en el nivel de nucleolina y una redistribución en el núcleo fue observada (Strang 2010).

Por ende existía la posibilidad que durante la infección por FCV, la nucleolina pudiera estar asociada en los complejos replicativos con el RNA y la proteasa polimerasa viral. Nuestros datos indican que el RNA viral, la proteasa polimerasa 3CD o NS6/NS7 y la nucleolina se encuentran asociados, y que al menos las dos últimas colocalizan en la región perinuclear, lo cual implica un movimiento de esta proteína hacia esta región a través de un mecanismo todavía desconocido. La colocalización de la nucleolina y la replicasa del HCV en la región perinuclear, ha sido previamente reportada durante la replicación de este virus (Hirano 2003). En esta región perinuclear se ha reportado que ocurre la síntesis del RNA de cadena positiva, en complejos derivados de la membrana del retículo endoplásmico, mismas que también han sido detectadas en células CrFK infectadas por FCV (Green 2002). Reportes recientes apuntan a que el origen de vesículas membranosas derivadas de retículo endoplásmico son inducidas durante la infección por FCV y MNV (Bailey 2010 y Hyde 2009). Particularmente en el curso de la infección por MNV se observó que el dsRNA y 3CD o NS6/NS7 fueron observados que proliferaban a partir de puntos localizados en la región perinuclear (Hyde 2009). Con lo anterior nosotros encontramos que nucleolina 3CD o NS6/NS7 de FCV y PDI una proteína que ha sido reportado como marcador de retículo endoplásmico están presente en fracciones de membranas aislados como CRs.

Dado que las células CrFK infectadas por FCV dan como resultado la localización de la proteasa-polimerasa con nucleolina, ya que ambas fueron observadas en un área perinuclear y que además las proteína están presentes en RCs y asociadas con RNA viral, era probable que la nucleolina participara de alguna

manera en la replicación del FCV. Esto fue confirmado mediante el uso de si específicos para nucleolina, con los cuales se redujo la expresión de la nucleolina y como consecuencia, se presentó una reducción significativa de la producción de 3CD o NS6/NS7 de FCV y de la replicación viral, lo cual indica que la nucleolina una proteína celular del hospedero que se requiere para la replicación eficiente del FCV. Dado que la viabilidad celular no se afectó cuando se inhibió la síntesis de la nucleolina, podemos concluir que el efecto de la reducción de la misma en la producción viral es específica y no se debe a alteraciones generales del metabolismo celular producidas por la falta de dicha proteína, al menos en los tiempos con los que se realizaron los ensayos de infección.

Debido a que ambas actividades de proteasa y polimerasa están presentes en la proteína 3CD o NS6/NS7 es posible que una actividad de proteasa pueda tomar lugar en el área perinuclear, en este sentido una relocalización citoplasmática nuclear de proteínas celulares después de la infección por FCV han sido reportadas recientemente (Bailey 2010). Este descubrimiento podría estar relacionado con la alteración de la composición del complejo del nucleoporo por la actividad de proteasa del FCV y reportado durante la infección por PV (Kurt 2001).

Aunque la función exacta de nucleolina en el ciclo de vida de los calicivirus no está bien determinada, esta parte del trabajo identifica un factor celular crítico para el ciclo de replicación del FCV y sólo queda obtener más información sobre el ciclo replicativo de los miembros de esta familia.



## **RESUMEN DE RESULTADOS**

- 1) Se obtuvieron anticuerpos que reconocen a la proteína recombinante 3CD o NS6/NS7 y a la 3CD o NS6/NS7 en células infectadas con el FCV tanto en WB como en ensayos de IF.
- 2) La proteína 3CD del FCV se localiza en extractos citoplásmicos y nucleares.
- 3) La presencia de la 3CD o NS6/NS7 en el núcleo fue corroborada por microscopia confocal.
- 4) Se observó que en las células transfectadas transitoriamente con 4EGFP-3CD o NS6/NS7 la localización de ésta es principalmente citoplásmica y solo se ve una translocación al núcleo en células CrFK infectadas con el FCV a una MOI de 100.
- 5) Los ensayos de inmunofluorescencia sugieren que la nucleolina co-localiza con la 3CD en el núcleo de células infectadas
- 6) Se observó que al transfectar con los siRNAs para Nucleolina, esta se abatió en un 80% y la viabilidad celular no se modifico significativamente.
- 7) La nucleolina participa de manera positiva en la replicación del FCV.

## **CONCLUSIONES**

La 3CD o NS6/NS7 sugiere tener una secuencia de localización nuclear no clásica que solo se activa tras una super infección con el FCV.

La proteína nucleolina, se asocia con la 3CD o NS6/NS7 y tiene un papel positivo en la replicación de FCV.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Akiko Makino, Masayuki Shimojima, Takayuki, Kentaro Kato, Yukinobu Tohya, and Hiroomi Akashi. Junctional Adhesion Molecule 1 is Functional Receptor for Feline Calicivirus. *J. of Virology*, May 2006 4482-4490.
- Aleth Calle, Iva Ugrinova, Alberto L. Epstein, Philippe Bouvet , Jean-Jacques Diaz y Anna Greco. Nucleolin is required for an efficient Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *J. of Virology*, May 2008 4762-4773.
- Bailey, D., Karakasiliotis, I., Vahist, S., Chung, L. M. W., Reese, J., McFeeden, N., Benson A., Yarovinsky, F., Simmonds, P., and I. Goodfellow. 2010. Functional analysis of RNA structures present at the 3' extremity of the murine norovirus genome: the variable polypyrimidine tract plays a role in viral virulence. *J. Virol.* 84:2859-2870.
- Bailey, D., Kaiser, J. W., Hollinshead, M., Moffat, K., Chaudhry, Y., Weilman, T., Sosnovtsev, S. V., and I. G. Goodfellow. 2010. Feline calicivirus p32, p39 and p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation. *J. Gen. Virol.* 91:739-749.
- Beetz Christian, Michael Brodhun, Konstantin Moutzouris, Michael Kiehntopf, Alexander Bernt, Dirk Lehnert, Thomas Deufel, Martin Bastmeyer and Jörg

Schickel. 2004. Identification of nuclear localization sequences in spastin (SPG4) using a novel Tetra-GFP report system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318. 1079-1084.

- Belliot, G., Sosnovtsev, S.V., Chang, K.O., Babu, U. et al; 2005. Norovirus Proteinase-polymerase and polymerase are both active forms at RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 79:2393-2403.
- Bertrand, L., Leiva-Torres, G. A., Hyjazie, H., and A. Pearson. 2010. Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J. Virol.* 84:109-118.
- Bienz, K., D. Egger, and T. Pfister. 1994. Characteristics of the poliovirus replication complex. *Arch. Virol. Suppl.* 9: 147-157.
- Blair L. Strang, Steeve Boulant and Donald m. Coen. Nucleolin Associates with the human cytomegalovirus DNA polymerase Accessory Subunit UL44 and is necessary for efficient Viral Replication. *J. of Virology.* Feb. 2010. 1771-1784.
- Bode, J. G., Brenndörfer, E. D., Karthe, J., and D. Häussinger. 2009. Interplay between host cell and hepatitis C virus in regulating viral replication. *Biol. Chem.* 290:1031-1032.

- Borroughs, J. N. And Brown, F. 1978. RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VPg for interactivity. *Virology*. 210:383-390.
- Callé, A., Ugrinova, I., Epstein, A. L., Bouvet, P., Diaz, J. J., and A. Greco. 2008. Nucleolin is required for an efficient Herpes Simplex Virus type 1 infection. *J. Virol*. 82:4762-4773.
- Carter, M. J., I.D. Milton, J. Meanger, M. Bannett, et al; 1992. The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus. *Virology*. 190:443-448.
- Clarke, I.N. and P.R. Lambden. 1997. The molecular biology of calicivirus. *J. Gen. Virol*. 78:291-301.
- Clarke, I.N. and P.R. Lambden. 2000. Organization and expression of calicivirus genes. *J. Gen. J. Infect. Dis*. 184 (Suppl.2):5309-5316.
- Enjuanes, L., Almazan, F., Solá, I., and S. Zuñiga. 2006. Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interactions *Annu. Rev. Microbiol*. 60:211–30.
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., and P. Bouvet. 1999. Structure and function of nucleolin. *J Cell Sci*. 112:761-772.

- Green, K. Y., Mory, A., Fogg, M. H., Weisberg, A., Belliot, G., Wagner, M., Mitra, T., Ehrenfeld, E., Cameroon, C. E., and S. Sosnovtsev. 2002. Isolation of enzymatically active replication complexes from Feline Calicivirus-Infected Cells. *J Virol.* 76:8582-8595.
- Gutiérrez-Escolano A. L., Vázquez-Ochoa, M., Escobar-Herrera, J., and J. Hernández-Acosta. 2003. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *BBRC.* 311:759-766.
- 
- Gutiérrez-Escolano, A. L., Uribe-Brito, Z., del Ángel, R. M. and X. Jiang. 2000. Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *J. Virol.* 74:8558-8562.
- Hardy, M.E., Crone, T. J., Brower, J. E. And Ettayebi K. 2002. Substrate specificity of the Norwalk virus 3C-Like proteinase. *Virus Res.* 89:29-39.
- Herbert, T. P., Briertey and T.D. Brown.1997. Identification of a protein linked of the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J. Gen. Virol.* 78:1033-1040.
- Hervé Ginisty, Helene Sicard, Benoit Roger and Philippe Bouvet. 1999. Structure and functions of nucleolin. *Journal of Cell Science* 112, 761-772.

- Hirano, M., Kanaeko, S., Yamashita, T., Luo, H., Qin, W., Shiota, Y., Nomura, T., Kobayashi, K., and S. Murakami. 2003. Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B\*. *J. Biol. Chem.* 278:5109-5115.
- Hiscox, J. A. 2002. The nucleolus-a gateway to viral infection? *Arch Virol.* 147:1077-1089.
- Hiscox, J. A. 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nature Reviews.* 5:119-127.
- Hong-Bin Shen, Kuo-Chen Chou. 2006. Virus-PLoc: A Fusion Classifier for predicting the Subcellular Localization of Viral Proteins Within Host and Virus-Infected Cells. *Biopolymers Volumen 85/ Number 3.* 233-240.
- Hyde, J. L., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., Wobus, C., Virgin, H. W., and J. M. Mackenzie. 2009. Mouse Norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. *J Virol.* 83:8709-8719.
- Karakasiliotis, I., Chaudhry, Y., Roberts, L. O., and I. G. Goodfellow. 2006. Feline calicivirus replication: requirement for polypyrimidine tract-binding protein is temperature-dependent. *J. Gen. Virol.* 87:3339-3347.

- Kazuko Shiroki, Takeshi Isoyama, Shusuke Kuge et al., 1999. Intracellular redistribution of truncated La Protein produced by Poliovirus 3CD<sup>Pro</sup> Mediated Cleavage. *J. Virol.* 73:2193-2200.
- Kurt, E. G., and P. Sarnow. 2001. Effects of poliovirus infection on nucleocytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *The EMBO J.* 20:240-249
- Kuyumku-Martínez, M., Belliot, G ., Sosnovtsev, S.V., et al. 2004. Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly (A).binding protein. *J. Virol.* 78:8172-8182.
- Langue Allison, Ryan E. Mills, Christopher J. Lange, Murray Stewart Scott E. Devine and Anita H. Corbett. 2007. Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with importin  $\alpha$ . MiniReview. *Journal of Biological Chemistry.* February 23. Volume 282 number 8. 5101-5105.
- Lymberopoulos, M. H., and A. Pearson. 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology.* 363:397-409.
- Masiuk, M. 2008. Nucleolin-characteristics of protein and its role in biology of cancers and viral infections. *Adv Cell Biol.* 35:1-19.



- Matthews, D. A. 2001. Adenovirus Protein V induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm, J. Virol. 75:1031-1038.
- Mayo, M.A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. Arch. Virol. 147:1655-1663.
- Mitra, T., Sosnovtsev, S.V and Green, K.Y. 2004. Mutagenesis of tyrosine in the VPg protein is lethal for feline calicivirus. J. Virol. 78:4931-4935.
- Neill, J.D., I.M. Reardon and R.I. Henriksen. 1991. Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. J. Virol. 65:5440-5447.
- Pfister, T and Wimmer E. 2001. Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. J. Virol. 75:1611-1619.
- Prasad, B.V., Hardy, M.E., Dokland, et al. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. Science. 286:287-290.
- Pryor J. Melinda, Stephen M. Rawlinson Rebecca E. Butcher, Chenoa L. Barton, Tracey A. Waterhouse, Subhash G. Vasudevan, Phillip G. Bardin, Peter J. Wright, David A. Jans and Andrew D. Davidson. 2007. Nuclear Localization of Dengue Virus Nonstructural Protein 5 Through its Importin  $\alpha/\beta$  Recognized

Nuclear Localization A Sequences is Integral to Viral Infection. *Traffic*. 8: 795-807.

- Rakhi Sharma, Santanu Raychaudhuri and Asim Dasgupta. 2004. Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off. *Virology* 320: 195-205.
- Rikinori Murayama, Yuichi Harada, Toshikatsu Shibata, Kazumichi Kuroda, Satoshi Hayakawa, Kazufumi Shimizu y Torahiko Tanaka. 2007. Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochemical and Biophysical research Communications* 362: 880-885.
- Sadowy, E., Milner, M and Haenni, A. L. 2001. Proteins attached to viral genomes are multifunctional. *Adv. Virus, Res.* 57:185-262.
- Simmonds, P., Karakasiliotis, I., Bailey, D., Chaudhry, Y., Evans, D. J., and I. G. Goodfellow. 2008. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res.* 36:2530-2546.
- Strang, B. L., Boulant, S., and D. M. Cohen. 2010. Nucleolin associates with the human cytomegalovirus DNA polymerase accessory subunit UL44 and is necessary for efficient viral replication. *J Virol.* 84:1771-1784.

- Sosnivitsev, S and Green, K.Y. 1995. RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VPG of infectivity. *Virology*. 210:393-390.
- S.P. Amineva, A.G. Aminev, A.C. Palmenberg and J.E. Gern. 2004. Rhinovirus 3C protease precursors 3CD and NS6/NS7 and 3CD' localize to the nuclei of infected cells. *J. of Virology*. 85: 2969-2979.
- Stuart D. Amanda and T. David K. Brown. 2006. Entry of Feline Calicivirus is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis and Acidification in Endosomes. *J. Virol.* 82: 7500-7509.
- Shunichi Kosugi, Masako Hasebe, Nobutaka Matsumura, Hideaki Takashima, Etsuko Miyamoto-Sato, Masuru Tomita and Hiroshi Yanagawa. 2008. Six Classes of Nuclear Localization Signals Specific to Different Binding Grooves of Importin  $\alpha$ . *J. of Biological Chemistry*. Volumen 284 Number 1. January. 478-485.
- Vazquez, A.L. Martin Alonso, J.M. , Casais, R., et al. 1998. Expression of enzymatically active rabbit hemorrhagic disease virus RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 72:2999-3004.

**Nucleolin interacts with the Feline calicivirus 3' untranslated region and the protease-polymerase NS6/7 protein, playing a role in virus replication.**

**Running title:** Role of Nucleolin in FCV replication

Clotilde Cancio-Lonches,<sup>1,5</sup> Martha Yocupicio-Monroy,<sup>2</sup> §Carlos Sandoval-Jaime,<sup>1</sup> Iván Galvan-Mendoza,<sup>3</sup> Luis Ureña,<sup>4</sup> Surender Vashist,<sup>4</sup> Ian Goodfellow,<sup>4</sup> Juan Salas-Benito,<sup>5</sup> and Ana Lorena Gutiérrez-Escolano<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, D. F.

<sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México, D. F.

<sup>3</sup>Laboratorios Centrales, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, D. F.

<sup>4</sup>Section of Virology, Faculty of Medicine, Imperial College of London, St Mary's Campus, Norfolk Place, London W2 1PG, UK

<sup>5</sup>Departamento de Biomedicina Molecular, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN, México, D. F.

§ Present address: Laboratory of infectious Diseases, NIAID, NIH, Bethesda, MD 20892, USA.

**Correspondent Footnote:**

\*Corresponding author mailing address:

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN  
Av. IPN 2508. Col. San Pedro Zacatenco  
México, D.F. C.P. 07360, México.

Phone: (52) 5747-3800 ext. 5647

Fax: (52) 57473377

E-mail:

alonso@cinvestav.mx

## ABSTRACT

Cellular proteins play many important roles during the life cycle of all viruses. Specifically, host-cell nucleic-acid-binding proteins interact with viral components of positive stranded RNA viruses and regulate viral translation as well as RNA replication. Here, we report that nucleolin, an ubiquitous multifunctional nucleolar shuttling phosphoprotein, interacts with the Norwalk virus and feline calicivirus genomic 3' UTRs. Nucleolin can also form a complex *in vitro* with recombinant Norwalk virus NS6/7 and can be co-purified with the analogous protein from feline calicivirus (p76 or NS6/7) from infected feline kidney cells. Nucleolin RNA levels or protein were not modified during FCV infection, however as a consequence of the infection, nucleolin was seen to re-localize from the nucleoli to the nucleoplasm as well as to the perinuclear area where it co-localizes with the feline calicivirus NS6/7 protein. In addition, antibodies to nucleolin were able to precipitate viral RNA from feline calicivirus infected cells, indicating a direct or indirect association of nucleolin with the viral RNA during virus replication. siRNA mediated knockdown of nucleolin resulted in a reduction of the cytopathic effect and virus yield in CrFK cells. Taken together, these results demonstrate that nucleolin is a nucleolar component that interacts with viral RNA, NS6/7 and is required for feline calicivirus replication.

## INTRODUCTION

The *Caliciviridae* family of small positive stranded RNA viruses includes viruses, which infect both animals and humans, causing a wide range of diseases. Human caliciviruses (HuCVs), that encompass the genus *Norovirus* and *Sapovirus*, have received increased attention because of their established role as the etiologic agents of acute gastroenteritis (19). Particularly, noroviruses (NoV) are the most commonly detected pathogens both in sporadic cases and outbreaks of gastroenteritis (19, 53). Since HuCVs may not be conveniently propagated in cell culture, other animal caliciviruses such as the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV), the murine norovirus (MNV), and feline calicivirus (FCV) have been used as surrogates to study various aspects of the calicivirus life cycle in cell culture (59).

It has been widely established that the replicative cycle of positive strand RNA viruses requires the interactions between viral components with various host cell factors (2, 34, 35). In particular, the interaction of host-cell nucleic-acid-binding proteins with structured RNA elements, usually present at the 5' and 3' ends of the viral genome, has been extensively implicated in viral translation and replication (2). These interactions often contribute to the host specificity, tissue tropism, and pathology of infections.

One of the best studied mammalian RNA viruses, for which the role of host/viral-RNA structure interactions have been characterized extensively is poliovirus. Poliovirus (PV) translation and negative-strand RNA synthesis are coordinated by the interaction of a complex of host proteins: poly C binding protein (PCBP) and poly A binding protein (PABP), viral RNA and polymerase precursor 3CD (4, 23, 31). In addition, the immunodepletion of nucleolin, a host RNA binding protein that interacts with PV 3' UTR,

from a PV cell-free replication system, inhibits early yields of PV virions (59). Nucleolin has also been implicated in poliovirus translation via the interaction with the viral IRES (36).

Numerous other host cell factors have been implicated in the life cycle of several positive strand RNA viruses. Translation and replication of Hepatitis C virus (HCV) RNA depends on several host cell proteins such as La and PTB (15) and Rck/p54, LSm1, and PatL1, which regulate the fate of cellular mRNAs from translation to degradation in the 5'-3'-deadenylation-dependent mRNA decay pathway. The requirement of these proteins for efficient HCV RNA translation is linked to the interaction with *cis*-acting RNA elements located in the 5' and 3' UTRs of the viral genome (51). These proteins are also implicated in the replication of brome mosaic virus (BMV) and the bacteriophage Q $\beta$  (22, 46). Other host factors such as TIAR and the closely related protein TIA-1, components of stress granules (SG) bind to the West Nile Virus (WNV) 3'(-) SL RNA, facilitating replication (44). Finally, the cellular proteins La, polypyrimidine tract-binding protein (PTB), Y box-binding protein 1, PABP, and the translation elongation factor eEF-1 $\alpha$  bind to dengue virus 3' UTR (14). In particular, PTB translocates from the nucleus to the endoplasmic reticulum (ER) during dengue virus infection, and plays a role in modulating dengue virus replication (1).

For caliciviruses, the *in vitro* interaction between several host cell nucleic-acid-binding proteins and the 5' and 3' ends of Norwalk virus (NV) (28, 29), and FCV genomic RNA (41), has been reported. PCBP, La, hnRNP-L, poly A binding protein (PABP), and PTB were identified, among the proteins bound to the NV 3' UTR. However, other proteins of molecular weights from 120 to 33 kDa, also bound to the same region, were

not identified (29). Recently, it was established that PTB is required for efficient FCV replication in a temperature-dependent manner (41). Moreover, it was observed that as the levels of viral proteins rise during the course of virus infection, the nuclear-cytoplasmic shuttling of PTB is altered, causing an increase in the cytoplasmic levels of this protein, and an inhibition of viral translation initiation, contributing to the stimulation of viral RNA replication (41). In the present study, we report the identification of a host cell protein with molecular weight of 105 kDa that interacts with the 3' UTR of the NV and FCV genomes, as nucleolin. FCV infection had no apparent effect on the steady-state levels of either nucleolin RNA or protein; however, FCV infection resulted in nucleolin relocalization from the nucleoli to nucleoplasm and the perinuclear area, where it co-localizes with the FCV NS6/7 protein. Finally, using small interfering RNA (siRNA) to nucleolin, we show a marked inhibitory effect on FCV replication in CrFK cells confirming a functional role for nucleolin in the calicivirus life cycle.



## MATERIALS AND METHODS

**Cells and virus infection.** HeLa cells were grown in Dulbecco's minimal essential medium supplemented with 10% newborn calf serum, 5,000 U/ml of penicillin, and 5 µg/ml of streptomycin. The culture medium was changed every other day until the cells reached confluence. CrFK cells obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Md.), were grown in Eagle's minimal essential medium with Earle's BSS and 2mM L-glutamine (EMEM) that was modified by ATCC to contain: 1.0 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5 g/L sodium bicarbonate. The medium was supplemented with 10% horse serum, 5,000 U of penicillin and 5 µg/ml of streptomycin. Both cell lines were grown in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. CrFK infection with the feline calicivirus (FCV) F9 strain, (obtained from the American Type Culture Collection) (Rockville, Md.) was performed as previously described (50).

UV-treatment of FCV was conducted as previously described, with minor modifications (55). Briefly, virus stocks (1ml at  $8 \times 10^6$  pfu/ml) were placed on ice and irradiated with UV (254nm) light (Ultralum UV lamp) for 15, 30, 45, 60 and 90 min, at a distance of 5cm. UV treated viruses were analyzed for infectivity on CrFK cells to confirm inactivation. Virus irradiated for 45 min, which resulted in a complete loss of infectivity, was used in immunofluorescence assays to control for any non-specific effects of host cell proteins which may be present in the virus preparations.

***In vitro* transcription.** Two RNA molecular species that correspond to the complete 3' UTR from NV (nt 7588 to 7654) and FCV (7707 to 7699) were produced by *in vitro* transcription, using T7 RNA polymerase, from two PCR-amplified cDNAs

containing the respective regions. The NV cDNA 3' UTR was obtained by PCR as described previously (29). The FCV 3' UTR cDNA was obtained by one step RT-PCR from CrFK infected cells, using a sense primer that contain the bacteriophage T7 promoter sequence (5' TAATACGACTCACTATAGGGTCATATATCCCTTTGGG 3') and an anti-sense primer (5' CCCTGGGGTTAGGCGCAGG3'). The RT-PCR reaction was performed using a MLV reverse transcriptase kit (Invitrogen) at 40°C for 30 min followed by 35 cycles [94°C for 1 min, 55°C for 30 sec, and 68°C for 30s], using a Perkin-Elmer Cetus DNA thermocycler. The resulting amplicon was purified by a QIAquick gel extraction G-50 kit (Qiagen) before used as template for RNA synthesis. After *in vitro* transcription (Epicentre biotechnologies), the reaction mixture was treated with DNase RQ1 (Promega) at 37°C for 30 min to remove the DNA template in the presence of RNase inhibitors (Promega). Unincorporated nucleotides were removed by precipitation. For the synthesis of radiolabeled transcripts [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP or -ATP were included in the transcription reaction.

**Quantitative RT-PCR detection of Nucleolin.** Levels of expression of the nucleolin gene in FCV-infected CrFK cells were obtained using relative quantification of gene transcript and expression of the GAPDH gene as a housekeeping gene control. Briefly, six-well cell culture plates were infected with FCV at an moi of 10. After 1 h of adsorption at 37<sup>0</sup> C, wells were rinsed with PBS, and the cells in each well were collected at 0, 2, 4, and 8 hpi. The RNA was extracted with Trisol reagent (Invitrogen) following manufacturer's instructions and treated with DNase I (Biolabs). The resulted RNA quantity and quality were assayed using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). 1  $\mu\text{g}$  of RNA was reverse-transcribed

using Improm II RT (Promega) according to the manufacturer's instructions with oligo dT as a primer. The qPCR step was developed with recombinant DNA polymerase (Invitrogen) and Evagreen (Biotium), using the following primers for nucleolin: Fw (5' TGCAAGAAGCCAGCCGTCCAA 3') Rv (5' CCGAACAGAGCCGTCTGAACGATT 3'), and for GAPDH Fw (5' GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3'), Rv (5' GAAGATGGTGTGATGGGATTTCC 3'). Data were analyzed with the comparative  $\Delta\Delta C_t$  method. Non template and non reverse transcriptase controls were included for each time point and for each gene transcript to be detected. The reaction was performed three times in duplicate using 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

**Preparation of cell extracts.** For NP-40 extracts, cell monolayers were washed twice with cold PBS and once with detachment buffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl). After final wash, cells were resuspended in RSB/NP40 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 1% NP40), incubated 20 min at 4°C and centrifuged at 13,000 x g for 5 min in a Sorvall GSA rotor. Lysates were adjusted to 1 mM CaCl<sub>2</sub> and treated with micrococcal nuclease (15 µg per ml), and incubated at 20°C for 15 min. The nuclease was inactivated with 2 mM EGTA and the lysate centrifuged in a Sorvall MC 12 microfuge, at 13,000 x g for 15 min at 4°C. The supernatants were aliquoted, the concentration of proteins in each extract was determined by the Bradford assay (10), and the samples stored at -70 °C until use.

**Isolation of replicative complexes from cells.** Membrane fractions corresponding to FCV replicative complexes were obtained as described previously (27). The presence of nucleolin, PDI (Santa-Cruz biotechnology, Santa-Cruz, CA) and NS6/7 (40) were determined by western blotting.

**Electrophoretic mobility Shift Assay (EMSA).** Thirty  $\mu\text{g}$  of cell extracts from HeLa and CrFK cells were preincubated for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$  with the same amount of tRNA, in a buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 0.2 mM dithiothreitol, 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4 mM spermidine, 3 mM ATP, 2 mM GTP, and 10% (vol/vol) glycerol in a final volume of 10  $\mu\text{l}$ . Where indicated, monoclonal anti-nucleolin (C23-MS-3), and anti-GAPDH antibodies (0.6  $\mu\text{g}$ ) (Santa-Cruz biotechnology, Santa-Cruz, CA) were added separately to the corresponding reaction mixture and incubated for 30 min on ice.  $4 \times 10^5$  cpm of  $^{32}\text{P}$ -labeled NV or FCV RNAs were added to each reaction and incubated for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Before loading the gels, a final incubation with 20 units of RNase A and 20  $\mu\text{g}$  of RNase T1 was performed for 15 min at room temperature. The RNA-protein super-shifted complexes were analyzed by electrophoresis through a 6% polyacrylamide (acrylamide-bisacrylamide, 80:1) gel in 0.5X TBE buffer (90 mM Tris, 64.6 mM boric acid, 2.5 mM EDTA [pH 8.3]) and run at 20 mA for 4 h. Gels were dried and autoradiographed.

**Immunoprecipitation assay.** A UV cross-linking of HeLa cell extracts with the  $^{32}\text{P}$ -labeled NV 3' UTR was performed as described (29), and reactions were pre-cleared by incubation with 10  $\mu\text{l}$  of protein G-Agarose resin (Roche) for 2 h at  $4^{\circ}\text{C}$  followed by centrifugation at  $13,000 \times g$  for 5 min. The resultant supernatants were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with monoclonal anti-nucleolin or anti-GAPDH antibodies (Santa-Cruz biotechnology, Santa-Cruz, CA). The immune complexes were immobilized on protein G-agarose beads saturated with 2% bovine serum albumin for a further 2 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . Unbound material was removed by 5 washes with NETS buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 100 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-40). Bound

proteins were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) followed by autoradiography.

**Pull-down assay.** Two hundred  $\mu\text{g}$  of HeLa cells protein extract previously pre-absorbed with NiNTA Agarose resin (Qiagen) was brought to a final volume of 500  $\mu\text{l}$  with interaction buffer, (20mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 40 mM NaCl [pH 8], 0.5% Triton X100), and mixed with 50  $\mu\text{g}$  of Norwalk virus recombinant NS6/7 protein coupled to NiNTA Agarose resin or NiNTA alone as a control, and mixed overnight at 4°C. The beads were then collected by centrifugation at 380 x g for 2 min, at 4°C and washed 3 times with 500  $\mu\text{l}$  of washing buffer (20mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM NaCl [pH 8], 1% Triton X100, 10 mM Imidazol) for 10 min at RT. The complexes were eluted from the beads by the addition of loading buffer, boiled for 10 min, and electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred to nitrocellulose for western immunoblotting. Briefly, the membranes were blocked for 1 h with 5% skim milk, and incubated overnight at room temperature with the mouse monoclonal anti-nucleolin antibody, diluted 1:5000 in 0.05% tween-PBS solution. Then, incubated for 2 h at room temperature with goat-anti-mouse IgG antibody (Santa-Cruz biotechnology, Santa-Cruz, CA), diluted 1:10,000. The proteins were detected by enhanced chemiluminescence's kit (Super-signal West-Femto, Pierce). The same membranes were washed with western blot stripping buffer (Pierce) and incubated with anti-NS6/7 antibody (40).

**Co-Immunoprecipitation assay.** Fifty  $\mu\text{g}$  of infected CrFK NP40 protein extracts were pre-cleared by incubation with 10  $\mu\text{l}$  of protein G-agarose resin for 2 h at 4°C followed by centrifugation at 13,000 x g for 5 min. The clarified supernatant was then incubated either with a polyclonal anti-nucleolin (Santa-Cruz biotechnology, Santa-Cruz,

CA), or anti-actin antibodies (kindly provided by M. Hernández, CINVESTAV), overnight at 4°C on a rotator (Coldparmer). Immuno-complexes were immobilized on 10 µl of protein G-agarose resin saturated with 2% bovine serum albumin for an additional 2 h at 4°C. After five washes with NETS buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 100 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-40), bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and subjected to western-blot as described above.

**Co-Immunoprecipitation of viral RNA during infection.** The interaction of nucleolin with FCV viral RNA was studied during infection using RNA-co-immunoprecipitation. Briefly, CRFK cells were infected with FCV at a multiplicity of infection (moi) of 3 TCID<sub>50</sub>/cell. Cell lysates were prepared 5 hours post infection (hpi) using polysomal lysis buffer (10mM hepes, pH 7.0, 100mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40, 1mM DTT and protease inhibitors) and used in subsequent immunoprecipitations. Immunoprecipitations were carried out using a mouse monoclonal antibody to nucleolin (Invitrogen), rabbit polyclonal antibody to the viral RNA polymerase NS6/7 (or control purified rabbit IgG using protein A/G sepharose beads (Santa-Cruz biotechnology, Santa-Cruz, CA). Viral RNA co-immunoprecipitated in the immune complexes was isolated using the Genelute RNA purification system (Sigma) and subsequently RT-PCR amplified. Reverse transcription was performed using Superscript III (Invitrogen) and viral RNA specific primer IGRDG-64 (TTATCAAACCTTCGAACACATCACAGTG) as per the manufacturer's protocol. cDNA was then subjected to PCR using the primers IGRDG-58 (TGTACCTGTCACTTGGAAATCTC) and IGRDG-64 to produce a 583 base pair product encompassing nucleotides 4732-5314 of the FCV genome.

**Immunofluorescence assays.** CrFK cells ( $1.5 \times 10^5$ ) were seeded in a 6-well plate containing cover slips pre-treated with L-poly-lysine (0.1%) and grown overnight. CrFK infected cells at indicated times, were washed once with C buffer (MES hydrate 10mM ; NaCl 150mM ; EGTA 5mM,  $MgCl_2$  5mM and glucose 5mM) and treated with C buffer containing 4% paraformaldehyde and 0.5% Triton-X100, for 5 min, at room temperature. After another round of three washes with PBS, the cells were incubated with 2 ng/ $\mu$ l of anti-nucleolin antibody at 4°C overnight and washed again as described previously. Cells were incubated for 60 min at room temperature with anti-mouse antibody coupled to Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Cells were washed three times with PBS, incubated with the anti-NS6/7 antibody diluted 1:100 at 4°C overnight, washed again, and incubated with anti-rabbit antibody labeled with Alexa Fluor 594 (Invitrogen) for 1 hr at RT. Cells were washed three times with PBS and incubated with 1  $\mu$ g/ $\mu$ l of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), for 2 min. Cells were washed six times with PBS and three times with distilled water. Finally the cover slips were removed and treated with Vecta-Shield (Vector Laboratories A.C.). Samples were examined by confocal microscopy.

**Confocal microscopy.** For confocal microscopy, a Leica TCS-SP5 multiphotonic confocal laser scanning device fitted to an DMI 6000 fluorescence microscope (Fig. 4A) or a Leica TCS-SPE fitted to an DMI 6000 fluorescence microscope (Fig. 6A) were used. Images were taken with a 63X lambda blue 1.4 or 63X lambda blue 1.3 oil lenses respectively. Images were acquired as 8-bit TIFF files and imported into Power Point. The individual images were pseudocolored in their respective RGB channels.

**Design and synthesis of Nucleolin siRNAs.** The carboxyl-terminal nucleotide sequence of feline nucleolin was obtained by RT-PCR, from total RNA from CrFK cells, using a pair of oligonucleotides designed to amplify the carboxyl-terminal region of the murine nucleolin (Fwd 5'- GCGGCCGCATGGTGAAGCTCGCAAAG-3' and rev 5'- GCGGCCGCATGTCAGAACCAACTACACC-3'). This amplicon was sequenced, and used as a template for the design of siRNAs targeting nucleolin mRNAs (17). Two siRNAs duplexes, siRNA #1 (5'GCUUUAAAUCCUGUAAUAAA-3') and siRNA #2 (5'-CACUUUUGGCUAAAAUCUgGC-3') obtained by Applied Biosystems (México).

**siRNA-mediated knockdown of nucleolin.** For siRNA-mediated knockdown of nucleolin expression, transfections were carried out according to the protocol recommended by the manufacturer (siPORT<sup>TM</sup> Amine transfection agent, Applied Biosystems, Mexico). Briefly, CrFK cells were plated in a 6-well plate to reach 60% confluency. After 24 h, 5 µl of siPort and 60, 80 and 100 nM of siRNAs for nucleolin were mixed separately with 100 µl Opti-MEM respectively, for 10 min at RT. The two mixtures were combined, allowed to incubate at room temperature for 10 min and then diluted to 1 ml with 800 µl Opti-MEM. A 200 µl aliquot of the mixture was added directly to the cells, and transfection with the siRNAs was carried out at 37 °C for 8 h, followed by the addition of 1 ml growth medium and additional incubation for 24, 48 and 72 h. CrFK cells were treated in the same way with a non-targeting 20-25 nt siRNA as a control (Santa-Cruz biotechnology, Santa-Cruz, CA). Mock-transfected cells were treated with transfection reagent only. After transfection, cells were infected with FCV at an moi of 10 and lysed after 5 h post-infection. The levels of nucleolin, hnRNP A1, the viral protease-polymerase NS6/7 and NS3 (p39) proteins were determined by



western blotting. Viability of untreated and nucleolin siRNA treated cells was determined at 48 h using the Cell Titer 96 (Promega), following manufacturer's instructions.

**One-step growth curve.** CrFK cells previously transfected with specific siRNAs for nucleolin or a non-target siRNA used as a control were infected with FCV at an moi of 10. At various times post infection, cell supernatants were collected and virus yield determined by plaque assay. In addition, in a parallel experiment the cytopathic effect was evaluated by a phase-contrast microscopy.

**Computations RNA structure analysis.** Computer analysis of the RNA secondary structures were performed using the Mfold2 software (64) with default settings through the web interface at <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>. VARNA web applet was used to draw RNA secondary structures at <http://varna.lri.fr/>.

## RESULTS

**Nucleolin interacts with the 3'UTR of NV and FCV.** We have previously established that the polyadenylated NV 3' UTR was able to specifically interact with several cellular proteins present in HeLa cell extracts (29). Three of these proteins were identified as La, PTB and PABP. Among the non-identified proteins, one of the most abundant was a 105 kDa protein. The molecular weight of this protein was compatible with the molecular weight of nucleolin, a cellular multifunctional nucleolar protein that is implicated in cell proliferation and growth (25, 47, 56) as well as the life cycle of many RNA viruses (33, 38, 61).

In order to elucidate if nucleolin was present in the ribonucleoprotein (RNP) complex formed between the polyadenylated NV 3' UTR and HeLa cell proteins, an EMSA assay was performed in the presence of an anti-nucleolin antibody. As described previously (29), two well defined complexes, referred to as I and II, were observed when the NV 3' UTR was incubated with HeLa protein extracts (Fig 1A). When a monoclonal anti-nucleolin antibody was incubated with HeLa protein extracts prior to the addition of the RNA, the formation of complex II was abolished (Fig. 1A), while the same amount of control anti-GAPDH antibody did not alter formation of either complex (Fig. 1A). The inhibitory effect of anti-nucleolin antibody on complex II formation indicated that nucleolin was present in this complex and that the antibody binding ablated the nucleolin-3'UTR interaction. To date, the precise components of complex I are not known, but it may contain one or more of the factors we previously identified as also interacting the NV 3'UTR, namely PCBP, La, hnRNP-L, PABP, or PTB. The interaction between the NV 3'

UTR and nucleolin was further confirmed by immunoprecipitation of a 105 kDa protein following UV-crosslinking to the [ $\alpha$ - $^{32}$ P] UTP-labeled NV polyadenylated 3' UTR with the anti-nucleolin antibody, (Fig. 1B). This result and the inability of the anti-GAPDH antibody to immunoprecipitate any labeled protein (Fig. 1B), confirms that nucleolin binds to the polyadenylated NV 3' UTR. The identities of some of the lower molecular weight proteins showed in Fig 1B have been previously determined, such as PTB and La protein (29). Since nucleolin was able to interact with the NV 3'UTR *in vitro*, is it possible that this interaction would also take place during virus replication playing some role in the NV life cycle. However because HuCVs cannot be cultured in cells, we used FCV as a model system to examine the role of nucleolin in the calicivirus life cycle. Computational analysis indicated that although the primary sequence is considerably different, the predicted secondary structure of the 3' UTR from both NV and FCV are very similar (Fig. 2). The prediction for FCV and NV 3' UTRs showed stem-loop structures with a  $\Delta G = -11.0$  and  $-9.6$  respectively (Fig. 2A and B).

To analyze if nucleolin binds to the FCV 3' UTR, a UV-cross-linking assay was performed using a [ $\alpha$ - $^{32}$ P] UTP labeled FCV 3' UTR and extracts enriched with cytoplasmic membrane-associated proteins from uninfected and infected CrFK cells (Fig. 2C). Proteins with a molecular mass of 30 to 105 kDa from uninfected and infected cells were detected bound to this region (Fig. 2C). In addition, proteins with a molecular mass of 48 and 65 kDa were observed when extracts from infected cells were used. To determine if the 105 kDa protein was nucleolin, a super-shift assay was performed in the presence of an anti-nucleolin antibody. The interaction of the FCV 3' UTR with proteins present in CrFK cell extracts resulted in the formation of two major complexes, and one

minor complex, referred to as I, II, and III respectively (Fig. 2D), although additional minor complexes were also formed. As observed for the NV 3'UTR-nucleolin complex, a monoclonal anti-nucleolin antibody inhibited the formation of complex III, whilst anti-GAPDH antibody had no effect (Fig. 2D), confirming that nucleolin was present in complex III.

To validate that nucleolin associates with FCV RNA during virus replication, an RNA-co-immunoprecipitation assay was performed (Fig 2E). Nucleolin was immunoprecipitated from FCV infected CrFK cell extracts, the co-purified RNA extracted from the immunoprecipitated complex and subjected to RT-PCR using FCV specific primers. As expected, FCV RNA was co-purified with the viral RNA polymerase (NS6/7) but also with nucleolin (Nuc). No viral RNA was amplified when an irrelevant purified rabbit IgG antibody (IgG) was used. Taken together these results confirm that nucleolin is associated with FCV viral RNA during viral replication.

#### **Nucleolin RNA and protein levels remain unmodified during FCV infection.**

The expression and subcellular localization of cellular proteins implicated in viral replication are often modified during the course of infection. Thus, to determine if nucleolin expression is modified during FCV infection, the amount and integrity of nucleolin RNA, and protein was analyzed up to 8 hpi (Fig. 3). Nucleolin RNA (Fig. 3A), and protein levels detected by WB (Fig. 3B), and by quantitative western blotting (data not shown), remain constant through out the course of viral infection, and were detected in similar amounts to that observed in non-infected cells indicating that the gross levels of nucleolin RNA and protein were not altered during FCV infection.

**Nucleolin is re-localized from the nucleolus to the nucleoplasm after FCV infection.** Given that nucleolin is a shuttling protein present in the membrane, cytoplasm, nucleus, and most prominently in the nucleolus of a cell, it was important to determine the subcellular localization of the nucleolin during FCV infection. This aspect was analyzed by indirect immunofluorescence using confocal microscopy. As expected, in uninfected cells, staining of nucleolin with alexa fluor 488 (green) was observed concentrated in nucleoli foci, with less intense staining elsewhere in the nucleoplasm and cytoplasm (Fig. 4A). At 1 hpi an evident movement of nucleolin to the nucleoplasm is observed, although a weak staining is still present in nucleoli foci and cytoplasm. At 3 and 5 hpi, nucleolin was found almost exclusively in the nucleoplasm. Finally, at 7 hpi, nucleolin distribution was largely heterogeneous through the nucleoplasm in comparison to mock-infected controls (Fig. 4A). In agreement with the levels of nucleolin observed by western blot (Fig. 3B), the overall fluorescence intensities of nucleolin in the nuclei of infected cells showed no significant differences to that observed in uninfected cells. However, a reduction in the fluorescence intensities was observed at 7hpi (Fig. 4B), which correlates with the evident cytopathic effect reported at these times of infection. No re-localization of nucleolin was observed in cells infected with UV-inactivated virus (data not shown) confirming that the observed redistribution of nucleolin occurs as a consequence of active viral replication.

**Nucleolin associates with recombinant NV NS6/7 and with FCV NS6/7 proteins during FCV replication.** Since the 3' UTR is an important element for RNP complex formation and for the initiation of the negative strand RNA synthesis, we hypothesized that nucleolin could also be part of the replication complex formed with

RdRp. To test this possibility, we first analyzed the ability of recombinant NV NS6/7 to interact with nucleolin. For this purpose, a nickel agarose pull-down assay using a poly histidine tagged NV NS6/7 fusion protein was performed. Purified recombinant NV NS6/7 was bound to NiNTA resin (NiNTA-NV NS6/7), incubated with HeLa or CrFK cell extracts and the interacting proteins analyzed by western blot. NiNTA-His-NV NS6/7, but not NiNTA resin alone, was able to precipitate nucleolin present in cell extracts (Fig. 5A, left panel). The extracts used in this assay were largely devoid of nucleic acid as the result of micrococcal nuclease digestion, therefore we can conclude that the observed NS6/7-nucleolin interaction is likely to be protein-mediated and not occur as a result of binding an RNA intermediate.

Given that the rNV-NS6/7 protein was associated with nucleolin, the ability of the FCV NS6/7 protein to interact with nucleolin during virus infection was analyzed. The NS6/7 protein co-immunoprecipitated with a 105 kDa band, that corresponds to full-length nucleolin in CrFK cells infected with FCV (Fig. 5B, right panel). Additional bands of 98 and 70 kDa were also detected. The molecular weight of these products might correspond to specific degradation peptides generated by nucleolin autocatalysis, as previously described, most likely as a result of the particular conditions of the assay (11, 13). No detection of FCV NS6/7 was observed when the immunoprecipitation assay was performed with anti-actin antibody, suggesting that the immunoprecipitation of NS6/7 by the anti-nucleolin antibody was specific (Fig. 5B, right panel). As observed with NV, the interaction between FCV NS6/7 and nucleolin is likely to be a protein-protein interaction and not an RNA mediated interaction as all extracts used in this assays were treated

with micrococcal nuclease. Taken together these results indicate that nucleolin and the FCV NS6/7 protein interact during the course of FCV infection.

**Nucleolin co-localizes with FCV NS6/7 in the perinuclear region.** Since nucleolin re-localizes to the nucleoplasm after FCV infection, and because we found that nucleolin co-precipitates with FCV NS6/7 in infected cells, the subcellular localization of both nucleolin and FCV NS6/7 were analyzed by confocal microscopy (Fig. 6A). The FCV NS6/7 protein was detected by indirect immune staining with alexa fluor 594 (red). From 3 hpi, the FCV NS6/7 was observed mostly throughout the cytoplasm of the infected cells, however at 7 hpi, the majority of infected cells display a spherical shape. Nucleolin was labeled by indirect immune staining with alexa fluor 488 (green) and observed at 3, 5 and 7 hpi throughout the nucleus. Analysis of the merged images in optical sections indicated that both NS7 and nucleolin were present in the perinuclear area (Fig. 6A). The colocalization of both proteins is highlighted in white.

To further determine if nucleolin was present within FCV replication complexes (RCs) as would be predicted based on our RNA-coimmunoprecipitation data, RCs from both mock-infected and FCV-infected cells were prepared as previously described (27). Western blot analysis was used to examine the presence of nucleolin, FCV NS6/7 as well as protein disulfide isomerase (PDI) as a marker for the ER. Nucleolin, FCV NS6/7 and PDI were detected in the RCs obtained from FCV infected cells, while nucleolin was not observed in the corresponding fractions from mock-infected cells (Fig. 6B lanes 4 and 3 respectively). In contrast, nucleolin was present at equal levels in total cellular

lysates (TL) prepared from mock infected and FCV infected cells. These results indicate that nucleolin, FCV NS6 /7 and PDI are present in RCs from FCV infected cells.

**Inhibition of expression of nucleolin, results in the reduction of viral protein synthesis and FCV replication.** The results presented above show that in FCV infected cells, nucleolin undergoes re-localization to the nucleoplasm as well as the perinuclear area where it co-localizes with the FCV NS6/7 protein, suggesting that this association could have a role during viral replication. To begin to determine the role of nucleolin in the FCV life cycle, CrFK cells were transfected with two specific siRNA directed towards nucleolin and the levels of nucleolin were detected by western blot analysis. Transfection of nucleolin-specific siRNAs for 48 h resulted in an 82% decrease in nucleolin levels compared to cells transfected with the non-targeting siRNA, as estimated by densitometry (Fig. 7A). Nucleolin gene silencing was observed for at least 72 h (data not shown).

To analyze the effect of nucleolin knockdown on the production of viral proteins, CrFK transfected cells were infected with FCV, and after 5 hpi, the levels of NS6/7 were monitored by western blot. Nucleolin knockdown resulted in a 92% reduction in the NS6/7 levels compared to from cells transfected with the non-targeting siRNA (Fig. 7B and C). The reduction in the expression of NS6/7 as a result of the siRNA-mediated knockdown of nucleolin levels further suggests that nucleolin is important for FCV replication. As expected, a similar level of reduction was observed for the NS3 protein, confirming that nucleolin knockdown resulted in a reduction of the expression of the proteins produced from the viral polyprotein. The observed decreased production of viral



protein nucleolin siRNA transfected cells was not due to any gross effects on host protein synthesis as the levels of hnRNPA1 were unaffected (Fig. 7 A and B), as was cell viability (Fig. 7D).

**Nucleolin is required for the efficient FCV replication.**

Since the reduction of nucleolin using siRNAs had a significant effect on the NS6/7 levels produced FCV infection, the consequences of nucleolin knockdown on FCV replication were evaluated by monitoring the levels of infectious virus produced. Nucleolin knockdown was found to reduce FCV yield by at least 1.5 logs after 4 h and 6 h of infection (Fig. 8A). Nucleolin siRNAs has no gross effect on FCV binding as similar levels of infectious virus was found bound to cells at time 0. In addition, although not monitored directly, the duration of the eclipse phase would indicate that virus entry was also largely unaffected. In agreement with the observed effect on viral titre, cells transfected with the nucleolin siRNA displayed reduced and delayed cytopathic effect when compared that observed in the non-target siRNA-treated cells (Fig. 8B). As previously stated, the viability of cells was unaffected by siRNA treatment (Fig 7B), therefore the observed decreased replication of FCV in nucleolin siRNA transfected cells was specific and not due to an indirect effect resulting in gross changes in cellular metabolism. These results taken together indicate that nucleolin is required for FCV replication.

## DISCUSSION

Positive strand RNA viral genomes often contain RNA elements that can vary greatly in their primary sequence but which maintain relatively consistent structures within virus families. Studies with numerous RNA viruses have highlighted that these RNA elements are extensively implicated in viral replicative cycle regulation (3, 9, 16, 18, 20, 31, 49, 62). These structured elements have been predicted to be formed within the genomes of several members of the *Caliciviridae* family (29, 54), and their functional role in viral replication has been confirmed for the MNV (6, 54). RNA stem-loop structures are targets for various cytoplasmic and nuclear factors that may function to regulate aspects of viral replication. Several cellular proteins such as La, PABP, PTB and PCBP-2 interact with the 5' and 3' ends of NV genomic RNA (28, 29). In addition, we have recently highlighted the role of PTB as a negative regulator of FCV translation, possibly contributing to the switch from translation to replication (6, 40). In this study, we describe that nucleolin, an ubiquitous multifunctional 105 kDa nucleolar shuttling phosphoprotein (25, 47) binds to the NV and FCV 3' UTR *in vitro*. This interaction was also found to occur during FCV replication in cell culture. Nucleolin is a multifunctional cellular nucleolar protein that is implicated in cell proliferation and growth; including functions during rRNA processing from rDNA transcription to assembly of pre-ribosomal particles (25, 47, 56). In the recent years, the role of nucleolin in viral infections has been widely established and supported by its co-localization with many viral components. In particular, nucleolin binds to several viral UTRs and participates in the replication of RNA viruses (33, 38, 60).

Nucleolin interacts with the 3' UTR of wild type PV but not the 3' UTR of a replication defective mutant and this interaction plays a role in viral genome amplification during the early stages of the viral life (60). The putative nucleolin binding site within the 3' end of the PV genome has been identified as a CAUUUUAGU sequence, located in a loop of a predicted pseudoknot structure (60). This sequence is very similar to the nucleolin binding site present in the amyloid precursor protein mRNA, which consists of a CAUUUUGGU sequence (63). The NV 3' UTR, contains a CAUUUAAU sequence that may represent a partial consensus binding site, however bioinformatic analysis indicates that it is not located in a loop structure (Fig 2B). Although no related sequences are present in the FCV 3' UTR, a previously identified nucleolin binding site in pre-rRNA (U/A)CCCG(A/G) (24, 32, 39) appears to be at least partially conserved in FCV (Fig 2A). A very similar sequence (ACCCCA) is present with the stem region of the FCV 3' UTR (Fig 2A). Although exact copies of the consensus nucleolin binding motifs were not present within the NV and FCV 3' UTRs, the protein can bind to both regions. It is also possible that nucleolin binding to the calicivirus 3'UTR relies on the interaction with a novel as yet unidentified binding site, as has been recently proposed for the tombusvirus 3' UTR-nucleolin interaction (38). Since comparable stem-loop RNA structures are present in both the NV and FCV 3' UTRs, it is likely that the nucleolin binding depends not only on the primary sequence but also the secondary (or tertiary) structure of the RNA, as has been reported for other cellular factors (30).

The expression and subcellular localization of cellular proteins implicated in viral replication are often modified during the course of infection. In this work, the levels and integrity of nucleolin RNA, and protein were not altered; however, FCV infection clearly

resulted in the redistribution of nucleolin from the nucleoli to the nucleoplasm, as well as the surrounding perinuclear area during the latter stages of virus replication. This type of nucleolin re-localization is also reported to occur as a result of various stress-related stimuli such as exposure to ionizing radiation, heat shock, oxidative shock and camptothecin, as well as a consequence of viral infection (47). Proteins from several viruses are known to co-localize with nuclear factors such as nucleolin, B23, and fibrillarin, resulting in their subsequent relocalization to play a role in the viral replication process (34, 35). Adenovirus (HAdV) and HSV-1 both interact with nuclear factors such as nucleolin (8, 12, 45, 48) and during HSV 1 infection, the viral protein *UL24*, required for efficient viral replication, induces the dispersion of nucleolin. In cells infected with human cytomegalovirus (HCMV), an increased level of nucleolin and re-distribution throughout the nucleus was observed (57). It has been suggested that nucleolin localization depends on its phosphorylation state (25), therefore, the possibility that the phosphorylation or dephosphorylation of nucleolin could be associated with its relocalization during FCV infection remains to be determined.

Our co-precipitation assay using recombinant NV-NS6/7 protein showed that this protein and nucleolin can associate to form a complex, although whether this is a direct protein-protein interaction or mediated by an unidentified intermediary is not clear. The analogous interaction in FCV was further confirmed by immunoprecipitation assays with antisera to the FCV NS6/7 protein and extracts from FCV infected cells. The association of nucleolin with elements that are essential for the replication of the viral negative strand RNA such as the genomic 3' UTR and the NS6/7 protease polymerase protein suggests a role of this protein during calicivirus replication. Indeed the function of

nucleolin in the various steps of the replication cycle of other viruses is well documented: it has been reported that nucleolin stimulates IRES-mediated translation (37); it plays a role during herpes simplex virus type 1 (HSV-1) egress (45), as well as in the budding and assembly of retrovirus virions (5, 58). Nucleolin has also been implicated in PV replication because of its ability to interact with the 3'UTR of the genomic RNA (60). Furthermore, nucleolin has been described as an indispensable factor for HCV replication due to its association with the replicase NS5B (33, 43, 52). In contrast, nucleolin binds to the 3' UTR of the tombusvirus genomic RNA and plays an inhibitory role during the early stages of tombusvirus replication, possibly via interference with the recruitment of viral RNA at the replication site (38).

Confocal laser scanning microscopy indicated that co-localization of the FCV NS6/7 and nucleolin occurs in the perinuclear area. Similar co-localization has been reported during HCV replication where the NS5B replicase-nucleolin association causes a change in nucleolin distribution from nucleoli to the perinuclear area (33). It is within these perinuclear sites that HCV-specific plus-strand synthesis is reported to take place, in replication complexes derived from the membranes of the ER (26). In CrFK cells infected with FCV, NS6/7 localization was reported predominantly in membrane associated replication complexes in the cytoplasm (27). Recent reports point to an ER derived origin of membranous vesicles induced during FCV and MNV infection (7, 36). Particularly, over the course of MNV infection, dsRNA and NS7 were observed to proliferate from punctuate foci located in the perinuclear region (36). In agreement with this information, we found that nucleolin, FCV NS6/7 and PDI, a protein that has been

reported as an ER marker, are present in partially purified membrane bound replication complexes.

Given that in FCV infected CrFK cells, the co-localization of the protease-polymerase with nucleolin was observed in the perinuclear area, that both proteins are present within RCs, and associate with the viral RNA, a role for nucleolin in the calicivirus life cycle was expected. This was confirmed subsequently by the use of siRNAs specific for nucleolin, which displayed a significant inhibitory effect on FCV NS6/7 production and virus replication. Furthermore, the reduced and delayed cytopathic effect, as well as the reduction in virus yield observed in cells transfected with the nucleolin siRNA, compared to the non-target siRNA-treated cells, indicates that nucleolin, a nucleolar host cell protein, is required for efficient FCV replication. Although not measured directly, since the growth characteristics and the viability of the cells were largely unaffected when transfected with nucleolin siRNAs, we can conclude that there was no gross effect on cell cycle progression that could affect the replication of the virus in an indirect manner.

Because both protease and polymerase activities are present in the NS6/7 protein; it is possible that a protease activity could also take place in the perinuclear area. To this regard, a nuclear-cytoplasmic re-localization of host cell proteins after FCV infection has been reported recently (6). This finding may be the result of the alteration of nucleopore complex composition by the FCV protease activity, as reported during PV infection (42).

Here, we report, that nucleolin, a nucleolar host cell protein, binds to the 3' UTR and the NS6/7 protease-polymerase, relocates from the nucleoli to the nucleoplasm and

act as a positive regulator of FCV replication. It is likely that nucleolin functions either directly or indirectly as an RNA chaperone promoting the formation of a complex suitable for translation and /or replication. Although the precise role of nucleolin in the calicivirus life cycle remains to be determined, this work identifies a cellular factor critical for the calicivirus life cycle gaining additional insights into the life cycle of this family of poorly understood pathogens.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Rosa M. del Angel and Juan Ludert for many helpful suggestions, and critical comments on the manuscript, and Fernando Medina for the cell cultures and Eduardo Carrillo for technical assistance. This work was supported by grants 43788-Q from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, and ICYTDF/247 from Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, México, D. F., to ALGE and by a grant from the Wellcome Trust to IG. IG is a Wellcome Senior Fellow.



## REFERENCES

1. **Agís-Juárez, R. A., I. Galván, F. Medina, T. Daikoku, R. Padmanabhan, J. E. Ludert, and del Ángel, R. M.** 2009. Polypyrimidine tract-binding protein is relocated to the cytoplasm and is required during dengue virus infection in Vero cells. *J. Gen. Virol.* **90**:2893-2901.
2. **Ahlquist, P., A. O. Noueir, W. M. Lee, D. B. Kushner, and B. T. Dye.** 2003. Host Factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J. Virol.* **77**:8181–8186.
3. **Alvarez, D. E., C. V. Filomatori, and A. V. Gamarnik.** 2008. Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3' UTRs. *Virology.* **375**:223-235.
4. **Andino, R., N. Boddeker, D. Silvera, and A. V. Gamarnik,** 1999. Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends Microbiol.* **7**:76-82.
5. **Bacharach, E., J. Gonsky, K. Allin, M. Oriova, and S. P. Goff.** 2000. The carboxy-terminal fragment of nucleolin interacts with the nucleocapsid domains of retroviral gag proteins and inhibits virion assembly. *J. Virol.* **74**:11027-11039.
6. **Bailey, D., I. Karakasiliotis, S. Vahist, L. M. W. Chung, J. Reese, N. McFeeden, A. Benson, F. Yarovinsky, P. Simmonds, and I. Goodfellow.** 2010. Functional analysis of RNA structures present at the 3' extremity of the murine norovirus genome: the variable polypyrimidine tract plays a role in viral virulence. *J. Virol.* **84**:2859-2870.
7. **Bailey, D., J. W. Kaiser, M. Hollinshead, K. Moffat, Y. Chaudhry, T. Weilman, S. V. Sosnovtsev, and I. G. Goodfellow.** 2010. Feline calicivirus p32, p39 and

- p30 proteins localize to the endoplasmic reticulum to initiate replication complex formation. *J. Gen. Virol.* **91**:739-749.
8. **Bertrand, L., G. A. Leiva-Torres, H. Hyjazie, and A. Pearson.** 2010. Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J. Virol.* **84**:109-118.
  9. **Bode, J. G., E. D. Brenndörfer, J. Karthe, and D. Häussinger.** 2009. Interplay between host cell and hepatitis C virus in regulating viral replication. *Biol. Chem.* **290**:1031-1032.
  10. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
  11. **Bugler, B., M. Caisergues-Ferrer, G. Bouche, H. Bourbon, and F. Amalric.** 1982. Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein. *Eur. J. Biochem.* **128**:475-480.
  12. **Callé, A., I. Ugrinova, A. L. Epstein, P. Bouvet, J. J. Diaz, and A. Greco.** 2008. Nucleolin is required for an efficient Herpes Simplex Virus type 1 infection. *J. Virol.* **82**:4762-4773.
  13. **Chen, C. M., S. Y. Chiang, and N. H. Yeh.** 1991. Increased stability of nucleolin in proliferating cells by inhibition of its self-cleaving activity. *J. Biol. Chem.* **266**:7754-7758.
  14. **De Nova-Ocampo, M., N. Villegas-Sepúlveda, and R. M. del Ángel.** 2002. Translation elongation-1a, La, and PTB interact with the untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology.* **295**: 337–347.

15. **Dominovitch, A. M., K. W. Diebel, N. Ali, S. Sarker, and A. Siddiqui.** 2005. Role of La autoantigen and polypyrimidine tract-binding protein in HCV replication. *Virology*. **335**:72-82.
16. **Dreher, T. W.** 1999. Functions of the 3'-untranslated regions of positive strand RNA viral genomes. *Ann Rev Phytopathol*. **37**:151-174.
17. **Elbashir, S. M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendecke, and T. Tusch.** 2001 Functional anatomy of siRNA for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*. **20**:6877-6888.
18. **Enjuanes, L., F. Almazan, I. Solá, and S. Zuñiga.** 2006. Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interactions *Annu. Rev. Microbiol.* **60**:211–30.
19. **Fankhauser, R. L., S. S. Monroe, J. S. Noel, C. D. Humphrey, J. S. Bresee, U. D. Parashar, T. Ando, and R. I. Glass.** 2002. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.* **186**:1-7.
20. **Filomatori, C. V., M. F. Lodeiro, D. E. Alvarez, M. M. Samsa, L. Pietrasanta, and A. V. Gamarnik.** 2006. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev.* **20**:2238-2249.
21. **Florez, P. M., O. M. Sessions E. J. Wagner, M. Gromeier, and M. A. García-Blanco.** 2005. The polypyrimidine tract binding protein is required for efficient picornavirus gene expression and propagation. *J. Virol.* **79**:6172-6179.
22. **Franze de Fernandez M. T., L. Eoyang, and J. T. August.** 1968. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature.* **219**:588-590.

23. **Gamarnik A., and R. Andino.** 1998. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* **12**:2293-2304.
24. **Ghisolfi-Nieto, L., G. Joseph, F. Puvion-Dutilleu, F. Amalic, and P. Bouvet.** 1996. Nucleolin is a sequence-specific RNA-binding protein: characterization of targets on pre-ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **206**:34-53.
25. **Ginisty, H., H. Sicard, B. Roger, and P. Bouvet.** 1999. Structure and function of nucleolin. *J Cell Sci.* **112**:761-772.
26. **Gosert, R., D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenshlager, H. E. Blum, K. Beinz, and D. Moradpour.** 2003. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol.* **77**:5487-5492.
27. **Green, K. Y., A. Mory, M. H. Fogg, A. Weisberg, G. Belliot, M. Wagner, T. Mitra, E. Ehrenfeld, C. E. Cameroon, and S. Sosnovtsev.** 2002. Isolation of enzymatically active replication complexes from Feline Calicivirus-Infected Cells. *J Virol.* **76**:8582-8595.
28. **Gutiérrez-Escolano, A. L., Z. Uribe-Brito, R. M. del Ángel, and X. Jiang.** 2000. Interaction of cellular proteins with the 5' end of Norwalk virus genomic RNA. *J. Virol.* **74**:8558-8562.
29. **Gutiérrez-Escolano A. L., M. Vázquez-Ochoa, J. Escobar-Herrera, and J. Hernández-Acosta.** 2003. La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of Norwalk virus genomic RNA. *BBRC.* **311**:759-766.
30. **Hellen, C. U., G. W. Witherell, M. Schmid, H. S. Shin, T. V. Pestova, A. Gil, and E. Wimmer.** 1993. A cytoplasmic 57 kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the

- nuclear pyrimidine tract-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:7642-7644.
31. **Herold, J., and R. Andino.** 2001. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. Mol. Cell. **7**:581-591.
32. **Hervé, G., G. Serin, L. Ghisolfi-Nieto, B. Roger, V. Libante, F. Amalric, and F. Bouvet.** 2000. Interaction of Nucleolin with an Evolutionarily Conserved Pre-ribosomal RNA Sequence Is Required for the Assembly of the Primary Processing Complex: J. Biol. Chem. **275**:18845-18850.
33. **Hirano, M., S. Kanaeko, T. Yamashita, H. Luo, W. Qin, Y. Shiota, T. Nomura, K. Kobayashi, and S. Murakami.** 2003. Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B\*. J. Biol. Chem. **278**:5109-5115.
34. **Hiscox, J. A.** 2002. The nucleolus-a gateway to viral infection? Arch Virol. **147**:1077-1089.
35. **Hiscox, J. A.** 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. Nature Reviews. **5**:119-127.
36. **Hyde, J. L., S. V. Sosnovtsev, K. Y. Green, C. Wobus, H. W. Virgin, and J. M. Mackenzie.** 2009. Mouse Norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. J Virol. **83**:8709-8719.
37. **Izumi, R. E., B. Valdez, R. Banerjee, M. Srivastava, and A. Dasgupta.** 2001. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. Virus Res. **76**:17-29.

38. **Jiang, Y., L. Zhenghe, and P. D. Nagy.** 2010. Nucleolin/Nsr1 binds to the 3' noncoding region of the tombusvirus RNA and inhibits replication. *Virology*. **396**:10-20.
39. **Johansson, C., L. D. Finger, L. Trantirek, T. D. Muller, S. Kim, I. A. Laird-Offinga, and J. Feigon.** 2004. Solution structure of the complex formed by the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and a pre-rRNA target. *J Mol Biol*. **337**:799-816.
40. **Karakasiliotis, I., Y. Chaudhry, L. O. Roberts, and I. G. Goodfellow.** 2006. Feline calicivirus replication: requirement for polypyrimidine tract-binding protein is temperature-dependent. *J. Gen. Virol.* **87**:3339-3347.
41. **Karakasiliotis, I., S. Vashist, D. Bailey, E. Abente, K. Green, O. L. Roberts, S. V. Sosnovtsev, and I. G. Goodfellow.** 2010. Polypyrimidine tract binding protein functions as a negative regulator of feline calicivirus translation. *Plos One*. **5**:1-17.
42. **Kurt, E. G., and P. Sarnow.** 2001. Effects of poliovirus infection on nucleocytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *The EMBO J*. **20**:240-249.
43. **Kusakawa, T., T. Shimakami, S. Kaneko, K. Yoshioka, and S. Murakami.** 2007. Functional interaction of Hepatitis C virus NS5B with nucleolin GAR domain. *J. Biochem.* **141**:917-927.
44. **Li, W., N. Kedersha, P. Anderson, M. Emara, K. M. Swiderek, G. T. Moreno, and M. A. Brinton.** 2008. Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-

- loop of the West Nile Virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J. Virol.* **76**:11989-12000.
45. **Lymberopoulos, M. H., and A. Pearson.** 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology.* **363**:397-409.
46. **Mas, A., I. Alves-Rodrigues, A. Noueir, P. Ahlquist, and J. Díez.** 2006. Host Deadenylation-Dependent mRNA decapping factors are required for a key step in Brome Mosaic virus RNA replication. *J. Virol.* **80**:246-251
47. **Masiuk, M.** 2008. Nucleolin-characteristics of protein and its role in biology of cancers and viral infections. *Adv Cell Biol.* **35**:1-19.
48. **Matthews, D. A.** 2001. Adenovirus Protein V induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm, *J. Virol.* **75**:1031-1038.
49. **Minkyung, Y., and S. M. Lemon.** 2003. Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA.* **9**:331-345.
50. **Oka, T., M. Yamamoto, M. Yokoyama, S. Ogawa, G. S. Hansman, K. Katayama, K. Miyashita, H. Takegi, Y. Tohya, H. Sato, and N. Takeda.** 2007. Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J. Virol.* **81**:6798-6808.
51. **Scheller, N., L. B. Mina, R. P. Gala, A. Charic, M. Gimenez-Barcons, A. Noueir, U. Fischer, A. Meyerhan, and J. Díez.** 2009. Translation and replication of hepatitis C virus genomic RNA depends on ancient cellular proteins that control mRNA fates. *PNAS.* **106**:13517-13522.

52. **Shimakami, T., M. Honda, T. Kusakawa, T. Murata, K. Shimotohno, S. Kaneko, and S. Murakami.** 2006. Effect of Hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J. Virol.* **80**:3332-3340.
53. **Siebenga J. J., H. Vennema, D. P. Zheng, J. Vinjé, B. E. Lee, X. L. Pang, E. C. Ho, W. Lim, A. Choudekar, S. Broor, T. Halperin, N. B. Rasool, J. Hewitt, G. E. Greening, M. Jin, Z. J. Duan, Y. Lucero, M. O’Ryan, M. Hoehne, E. Schreier, R. M. Ratcliff, P. A. White, N. Iritani, G. Reuter, and M. Koopmans.** 2009. Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001-2007. *J Infect Dis.* **1**:802-812.
54. **Simmonds, P., I. Karakasiliotis, D. Bailey, Y. Chaudhry, D. J. Evans, and I. G. Goodfellow.** 2008. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res.* **36**:2530-2546.
55. **Sosnovtsev, S. V., E. A. Prikhodko, G. Belliot, J. I. Cohen, and K. Y. Green.** 2003. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Res.* **94**:1-10.
56. **Srivastava, M., and H. B. Pollard.** 1999. Molecular dissection of nucleolin’s role in growth and cell proliferation: new insights. *FASCB J.* **13**:1911-1922.
57. **Strang, B. L., S. Boulant, and D. M. Cohen.** 2010. Nucleolin associates with the human cytomegalovirus DNA polymerase accessory subunit UL44 and is necessary for efficient viral replication. *J Virol.* **84**:1771-1784.



58. **Ueno, T., K. Tokunaga, H. Sawa, M. Maeda, J. Chiba, A. Kojima, H. Hasegawa, Y. Shoya, T. Sata, T. Kurata, and H. Takahashi.** 2004. Nucleolin and the packaging signal, psi, promote the budding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Microbiol. Immunol.* **48**:111-118.
59. **Vashist, S., D. Bailey, A. Putics, and I. Goodfellow.** 2009. Model systems for the study of human norovirus biology. *Future Virol.* **4**:353-367.
60. **Waggoner, S., and P. Sarnow.** 1998. Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocalization of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* **72**:6699-6709.
61. **Walter, B. L., T. B. Parsley, E. Ehrenfeld, and B. L. Semler.** 2002. Distinct poly (rC) binding protein KH domain determinants for poliovirus translation initiation and viral RNA replication. *J. Virol.* **76**:12008-12022.
62. **Yi, M., and S. M. Lemon.** 2003. 3' nontranslated RNA signals required for replication of Hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* **77**:3557–3568.
63. **Zaidi, S. H., and J. S. Malter.** 1994. Amyloid precursor protein mRNA stability is controlled by a 29-base element in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem.* **269**:24007–24013.
64. **Zuker, M.** 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31 (13), 3406-3415.

## FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Nucleolin binds to the Norwalk virus 3' UTRs. (A) Super-mobility shift assay of the [ $\alpha$ - $^{32}$ P] UTP labeled NV 3' UTR RNA incubated with HeLa cell extracts in the absence (lanes 1 and 2) or presence of human anti-nucleolin (lane 3) or anti-GAPDH antibodies (lane 4). Lane 1: free RNA. The position of complexes I and II is indicated. The arrow indicates the position of the complex competed with anti-nucleolin antibodies. (B) [ $\alpha$ - $^{32}$ P] UTP labeled NV 3' UTR RNA was cross-linked with HeLa cells extracts (lane 2) and immunoprecipitated with human anti-nucleolin antibody (lane 3) or anti-GAPDH antibody (lane 1). The arrow indicates the position of the immunoprecipitated labeled nucleolin. The asterisk indicates [ $\alpha$ - $^{32}$ P] UTP labeled NV 3' UTR RNA. A time line of addition of various reagents is indicated below each experiment.

FIG. 2. Predicted secondary structure of the Feline calicivirus 3' UTR, and its binding to nucleolin. (A) Predicted secondary structure of the complete FCV 3' UTR and (B) the complete NV 3' UTRs, using the Mfold 2 software (<http://mfold2.wustle.edu>). Potential nucleolin binding sites, as discussed in the text, are shaded. (C) [ $\alpha$ - $^{32}$ P] UTP labeled FCV 3' UTR (lanes 1 and 2) RNA were UV-crosslinked without (lane 1) or with non-infected (lane 2) or infected (lane 3) CrFK cell extracts. (D) Super-mobility shift assay of the [ $\alpha$ - $^{32}$ P] UTP labeled FCV 3' UTR RNA incubated with CrFK cell extracts (lanes 2-4) in the absence (lanes 1 and 2) or presence of human anti-nucleolin (lane 3) or anti-GAPDH antibodies (lane 4). The position of complexes I, II and III is indicated. The arrow indicates the position of complex I. (E) Antisera to the FCV NS6/7 protein or nucleolin precipitated viral RNA from FCV infected cells. Viral RNA was co-

immunoprecipitated from FCV infected CrFK cell extracts using an antibody directed against viral protease-polymerase (NS6/7), or an anti-nucleolin antibody (Nuc) respectively. Purified IgG (IgG) was used as a negative control. RNA was extracted from the immunoprecipitated complex or from an aliquot of the input lysate and subjected to RT-PCR using FCV specific primers as detailed in the material and methods section. RT-PCR products were visualized on a 1% agarose gel.

FIG. 3. Nucleolin RNA and protein expression during FCV infection. (A) Total RNA extracted from FCV infected CrFK cells at 1, 3, 5, and 8h was subjected to qRT-PCR using specific primers. Levels of expression of the nucleolin gene were obtained using relative quantification of gene transcript, and expression of the GAPDH gene as a housekeeping gene control. (B) Total cellular extracts from non infected prepared at either time 0 or 8 hours ( $M^0$  and  $M^8$ ) and infected FCV cells at an MOI of 3, were obtained at 2, 4, 6 and 8 hpi, and analyzed by western blot using human anti-nucleolin (upper panel) or anti-FCV NS6/7 antibodies (lower panel). GAPDH was used as the load control.

FIG. 4. Subcellular localization of nucleolin during FCV infection. (A) Monolayers of CrFK cells were infected with FCV at an moi of 10, or mock infected (NI). At 1, 3, 5 and 7 hpi, cells were fixed, and stained for nucleolin (polyclonal anti-nucleolin, green). The cells were examined using confocal microscopy. DAPI was used for nuclei (blue) staining. Omission of the primary antibody resulted in no nucleolin signal (data not shown). Scale bars, 40  $\mu\text{m}$ . Images correspond to a z-stack of 15 slices. (B)

Fluorescence intensities in the nucleoli and nucleoplasm at 0, 1, 3, 5 and 7 hpi were measured with the LAS AF Lite software, and expressed as a percentage of the relative intensity of the uninfected cells.

FIG. 5. NV rNS6/7 and FCV NS6/7 proteins co-precipitate with nucleolin. (A) Recombinant Norwalk virus (NV rNS6/7) coupled to NiNTA resin or NiNTA resin alone, were incubated with HeLa or CrFK cell extracts as indicated. After several washes, the precipitated proteins were analyzed by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and analyzed by western blot using human anti-nucleolin (right panel) or anti-NV rNS6/7 antibodies (left panel). (B) Anti-nucleolin or anti-actin antibodies were incubated with total extracts from FCV infected cells and immuno-complexes were immobilized in protein G-agarose resin, precipitated and analyzed by SDS-PAGE. The transferred proteins were analyzed by western blot using human anti-nucleolin (left panel) or anti-FCV NS6 (right panel) antibodies. PD: pull down; Co-IPP: co-immunoprecipitation. Input cell extracts are shown in the third line of each panel. Molecular weights of nucleolin and NV NS6/7 are indicated in the right side of the panels. Arrows indicate migration of nucleolin and NV rNS6/7.

FIG. 6. Nucleolin and NS6/7 co-localization during FCV infection. (A) Monolayers of CrFK cells were left non-infected (NI) or infected with FCV for 3, 5 and 7 h at an moi of 10, fixed and stained for NS6/7 (red) and nucleolin (polyclonal anti-nucleolin, green). DAPI was used for nuclei (blue) staining. 0.5- $\mu$ m-thick optical sections of non infected and infected cells were observed using confocal microscopy. Merged images of

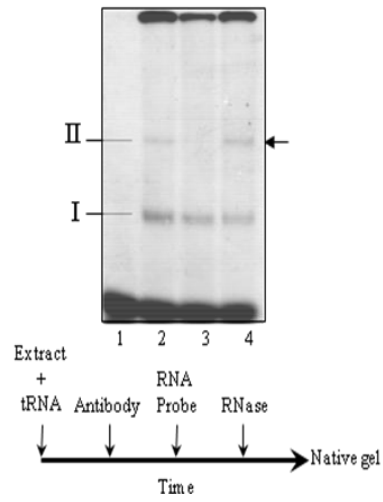
nucleolin and FCV NS6/7, and co-localization of FCV NS6/7 and nucleolin at 3, 5 and 7 hpi are highlighted in white. Co-localization analysis was performed using the LAS AF confocal software Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ . Images depicts a single confocal slice taken from a z-stack. (B) Proteins associated with total extracts (TL) or RC pellet (RC) were obtained from mock infected (lanes 1, and 3) and FCV infected cells (lanes 2, and 4), as described in materials and methods. The presence of nucleolin, FCV NS6/7 and PDI as an ER marker, was evaluated by western blotting.

FIG. 7. Effect of nucleolin silencing on the expression of FCV NS6/7. (A) CrFK cells were either left non-treated (lane 1), treated with siPort reagent alone (lane 2) or transfected with a non-targeting siRNA (lane 3) or with two siRNAs specific for feline nucleolin (lane 4). The levels of nucleolin expression were evaluated by western blotting. (B) CrFK cells were either non-treated (lanes 1 and 2), transfected with a non-targeting siRNA (lanes 3 and 4), or with two siRNAs specific for feline nucleolin (lanes 5 and 6) for 48 h. Cells were then either mock infected or infected with FCV (moi 10) for 5 h and the expression levels of nucleolin, FCV NS6/7, NS3 or p39, and hnRNP A1 used as the load control, were evaluated by western blotting in FCV infected (lanes 2, 4, and 6) and non-infected cells (lanes 1, 3, and 5). (C) Nucleolin and NS6/7 band intensities were quantified by densitometric analysis using the Quantity-One software (Bio-Rad), and expressed as the percentage in relation to the hnRNP A1 expression levels. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments. (D) Fourty eights hours after siRNA transfection, cell viability of untreated and nucleolin-siRNA treated cells was measured as described in materials and methods.

FIG. 8. FCV replication is inhibited by nucleolin siRNAs. (A) One-step growth curve analysis of FCV in CrFK cells treated with either non-targeting or nucleolin-specific siRNAs. CrFK cells treated with either non-targeting or nucleolin-specific siRNAs were infected with FCV (moi 10) and virus yield was determined at 0, 2, 4 and 6 hpi by plaque assay. Infections were performed a minimum of 5 times in duplicate with one representative data set shown. The error bars represent standard deviation. \* $P < 0.005$  \*\* $P < 0.001$  by one-way ANOVA. (B) Phase contrast microscopy of FCV infected cells transfected with nucleolin or non-targeting siRNAs. Note the delayed and reduced cytopathic effect in nucleolin-treated cells.

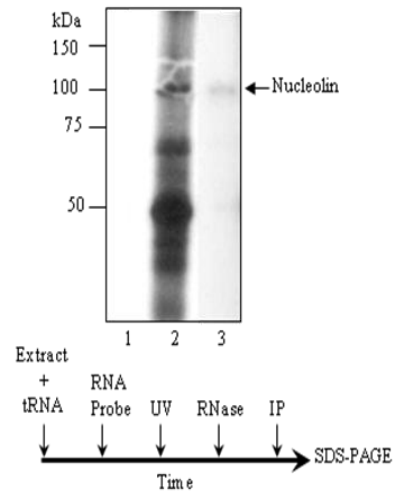
A

GAPDH	-	-	-	+
$\alpha$ -Nucleolin	-	-	+	-
HeLa extract	-	+	+	+
3'UTR *	+	+	+	+

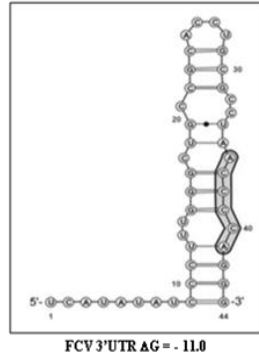


B

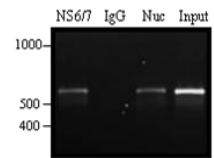
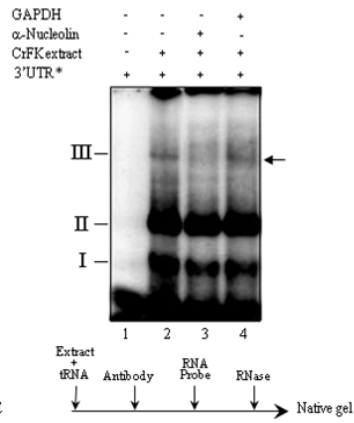
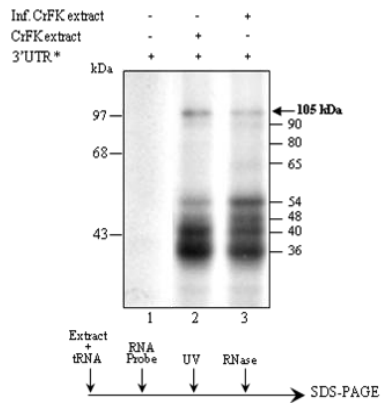
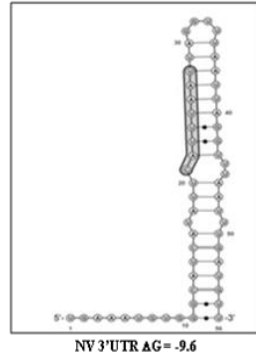
GAPDH	+	-	-
$\alpha$ -Nucleolin	-	-	+
HeLa extract	+	+	+
3'UTR *	+	+	+



A

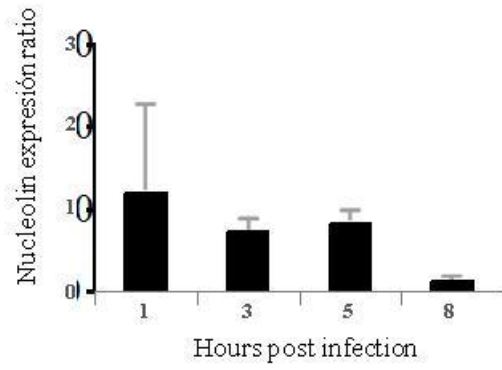


B

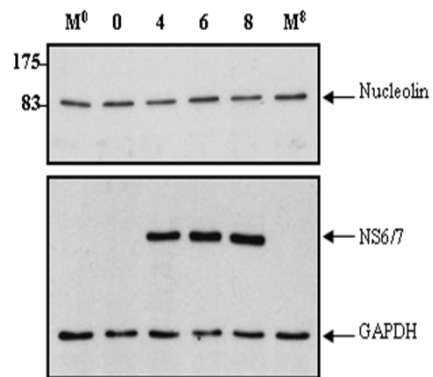




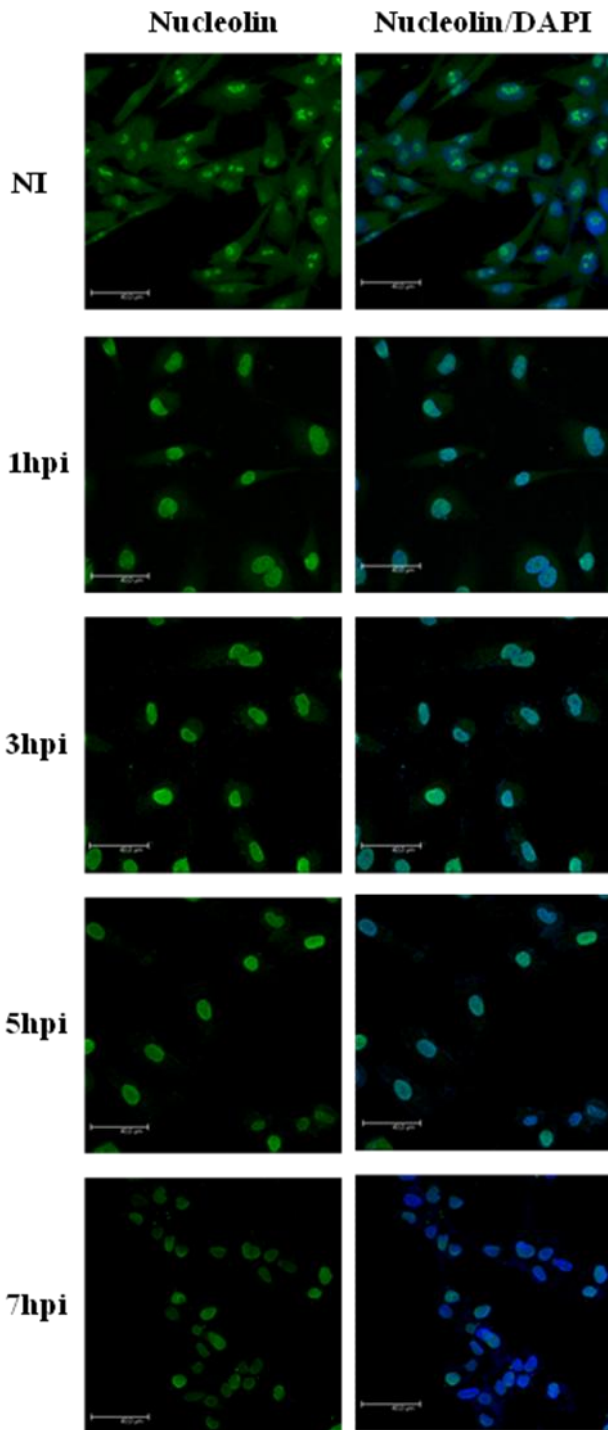
A



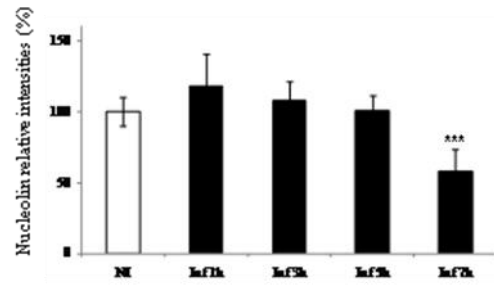
B

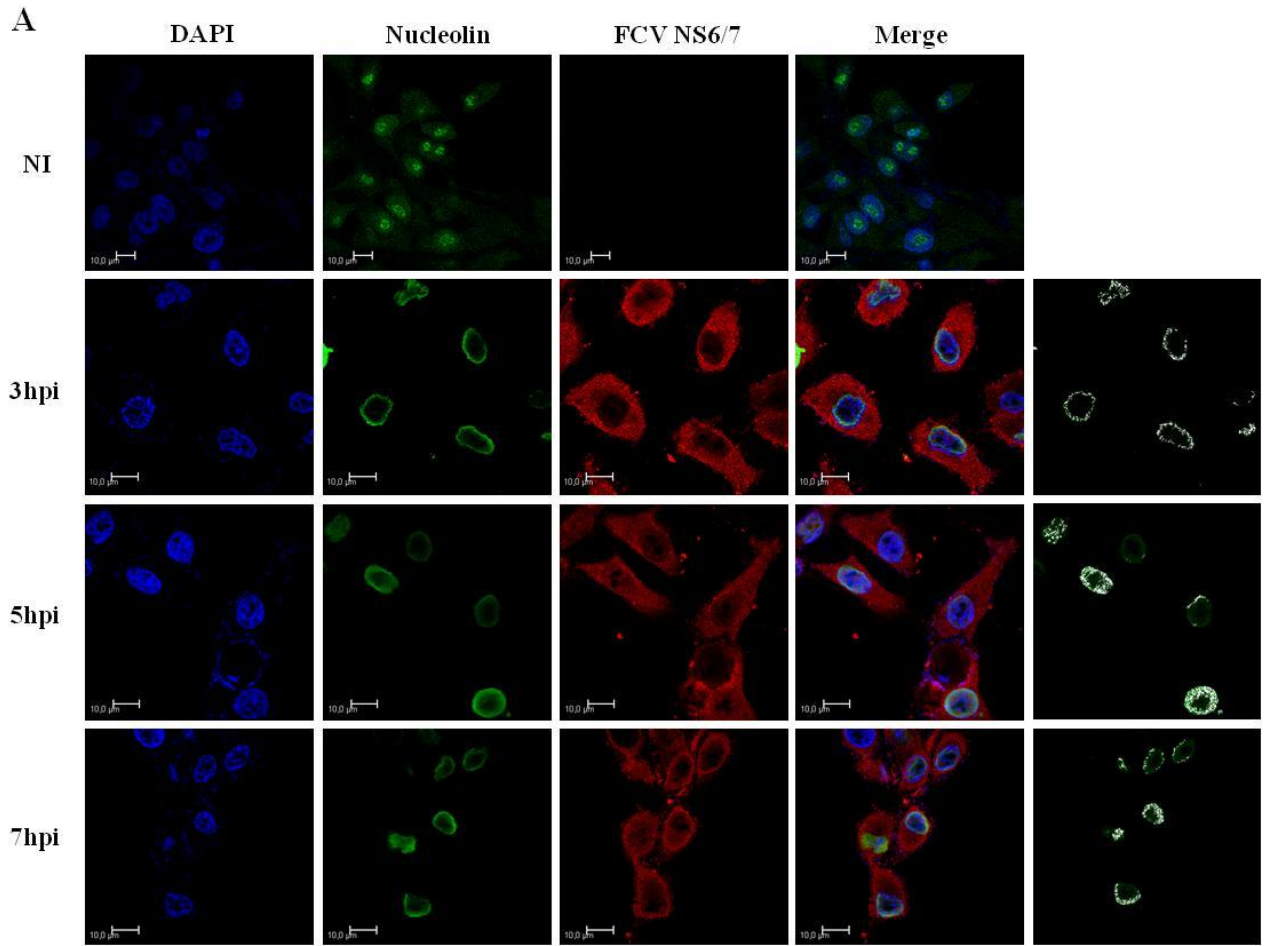


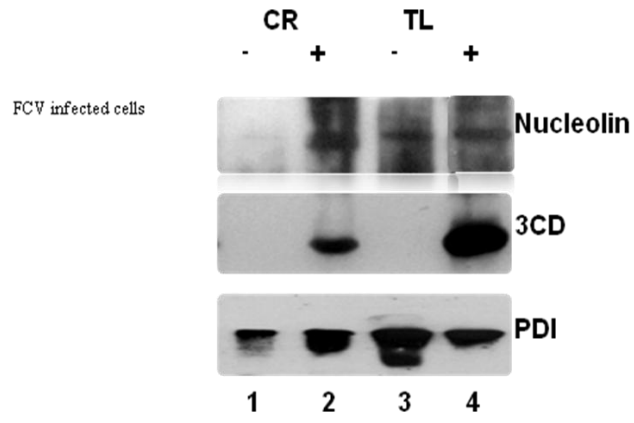
A



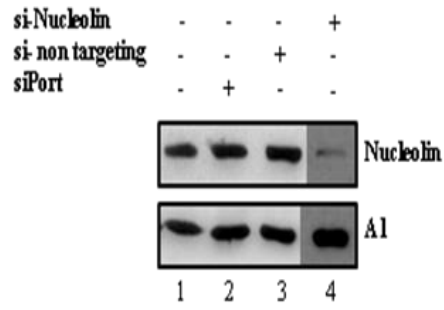
B



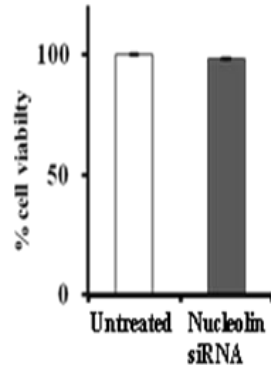




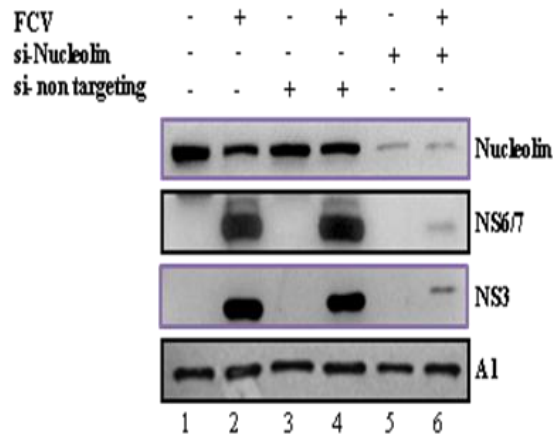
A



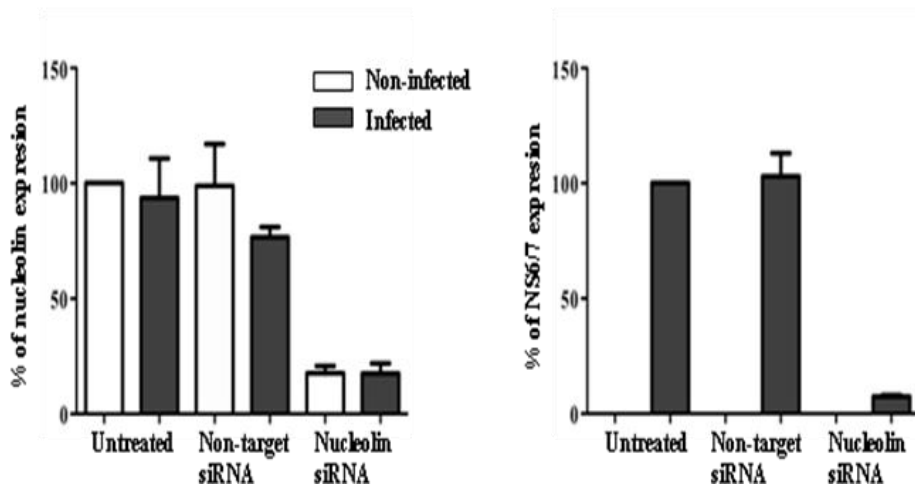
D



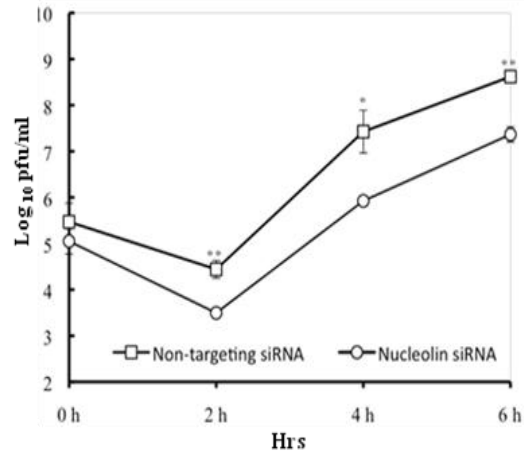
B



C



A



B

