

Tesis de Posgrado

Estudio de las interacciones del virus del dengue con la célula hospedadora

Mondotte, Juan Alberto

2011

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mondotte, Juan Alberto. (2011). Estudio de las interacciones del virus del dengue con la célula hospedadora. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4911_Mondotte.pdf

Cita tipo Chicago:

Mondotte, Juan Alberto. "Estudio de las interacciones del virus del dengue con la célula hospedadora". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4911_Mondotte.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DEL VIRUS DEL DENGUE
CON LA CÉLULA HOSPEDADORA**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Química Biológica

Juan Alberto Mondotte

Director de Tesis

Dra. Andrea V. Gamarnik

Consejero de Estudios

Dra. Elsa B. Damonte

Dr. Israel D. Algranati

80986

Lugar de Trabajo

Fundación Instituto Leloir-IBBIA-CONICET.

Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Buenos Aires, 2010.

Estudio de las interacciones del virus del dengue con la célula hospedadora

El virus del dengue produce en humanos la enfermedad viral más frecuentemente transmitida por artrópodos y no existe hasta el momento terapia antiviral ni vacuna alguna.

En este trabajo se desarrollaron diferentes herramientas genéticas con el fin de estudiar las distintas etapas de la replicación viral y la interacción del virus con la célula huésped. Así, se obtuvo el primer clon infeccioso del virus del dengue de un aislamiento argentino y distintas generaciones de virus con proteínas reporteras. Empleando estos sistemas genéticos se pudieron diseccionar las distintas etapas de la replicación viral. La manipulación del genoma viral permitió caracterizar mutantes de N-glicosilación de las proteínas de envoltura y pre-membrana, y estudiar su importancia en las distintas etapas del ciclo viral. El ensayo del virus reportero, el cual permite evaluar la actividad de luciferasa como un marcador de replicación viral, fue miniaturizado para realizar una búsqueda de quinasas de la célula huésped involucradas en la replicación. Para esto se utilizó la tecnología del RNA de interferencia a gran escala. Mediante este ensayo se identificaron distintas quinasas claves en la replicación del virus y se estudió su importancia en la replicación viral. Por último, se aportó nueva información sobre el mecanismo celular por el cual la proteína de cápside se dirige a las organelas celulares *lipid droplets*, y su relación con la proteína celular ADRP. Este trabajo provee nuevas herramientas genéticas y nueva información sobre los requerimientos del virus del dengue para replicar en la célula infectada. Además, realiza un aporte que podría llevar al desarrollo de nuevas estrategias antivirales.

Palabras Clave: dengue, flavivirus, clon infeccioso, virus reportero, replicación viral, N-glicosilación, *lipid droplets*.

Interactions between dengue virus and the host cell

Dengue is the most prevalent viral disease transmitted by arthropods. At present, neither antiviral therapies or licensed vaccine exist. In this work, we developed new genetic tools to study different steps of viral replication and host-viral interactions. We obtained the first infectious clone from an Argentinean clinical isolate, and several dengue virus reporter systems. Using these tools, we dissected each step of the viral replication process through a luciferase activity assay. Genetically manipulating the viral genome, we characterized N-glycosylation mutants of envelope and pre-membrane proteins, and their role during the viral life cycle. The reporter virus assay was miniaturized to perform an RNA interference screen to search for host kinases involved in viral replication. We identified several kinases important for different steps of viral replication. Finally, we provided new information about the cellular mechanism by which the capsid protein is targeted to cellular organelles known as lipid droplets, and investigated the relationship of capsid with the cellular protein ADRP. This thesis provides new genetic tools and new information on the cellular requirements for dengue virus replication, which could lead to the development of new antiviral strategies.

Keywords: dengue, flavivirus, infectious clone, reporter virus, viral replication, N-glycosylation, lipid droplets.

Los resultados de este trabajo de tesis han sido publicados parcialmente en los siguientes artículos:

Mondotte JA, Lozach PY, Amara A, Gamarnik AV. Essential Role of Dengue Virus Envelope Protein N-Glycosylation at Asparagine-67 During Viral Propagation. J. Virol. July 2007 Vol.81, No. 13, p. 7136-7148.

Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, Bozza PT, Gamarnik AV. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. PLoS Pathog. 2009 October; 5(10): e1000632

Kaptein SJ, De Burghgraeve T, Froeyen M, Pastorino B, Alen MM, Mondotte JA, Herdewijn P, Jacobs M, de Lamballerie X, Schols D, Gamarnik AV, Sztaricskai F, Neyts J. A derivate of the antibiotic Doxorubicin is a selective inhibitor of dengue and yellow Fever virus replication in vitro. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Dec; 54(12):5269-80. Epub 2010 Sep 13.

Agradecimientos

A la Dra. Andrea Gamarnik, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su confianza, por transmitirme su entusiasmo, su experiencia y su pasión por todo lo que hace.

A mis compañeros de laboratorio: Andrea Gamarnik, Silvana Fucito, Diego Alvarez, María Fernanda Lodeiro, Claudia Filomatori, Marcelo Samsa, Laura Talarico, Gabriel Iglesias, Kazuo Harada, Sergio Villordo, Leopoldo Geghard, Laura Byk y Ezequiel Aranovich; por su aporte fundamental para este trabajo y por hacer más lindo el día a día en el laboratorio.

A los numerosos colaboradores externos que ayudaron de una u otra manera para la realización de este trabajo: P.Y. Lozach, A. Amara, S.J. Kaptein, J. Neyts, R. Konig, S.K. Chanda, Florencia Iacaruso, Lía Pietrasanta, Paola Barrero y Soledad Fernández.

Al Dr. Israel Algranati, a la Dra. Elsa Damonte y al Dr. Armando Parodi, por sus comentarios críticos a través del Comité de Seguimiento de Tesis.

A la Fundación Instituto Leloir y todos sus integrantes, por permitirme trabajar en un lugar privilegiado.

Al CONICET, por haberme otorgado la beca de doctorado con la que realicé la mayor parte de este trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires por brindarme una educación pública y gratuita.

A mis padres, toda la familia grande y los amigos, por brindarme todo su apoyo durante estos años.

A la familia chica (Cecilia) por su ayuda en la corrección del manuscrito, por su amor y por elegirme para compartir nuestras vidas

A Lucy, Arturo, Franco y Vito

"El éxito es aprender a ir de fracaso en fracaso si desesperarse"

Winston Churchill

Índice

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas | 11 |
| Introducción general | 12 |
| El Virus del Dengue | 12 |
| Origen | 12 |
| Transmisión del virus del dengue | 13 |
| Características clínicas de la enfermedad | 14 |
| Clasificación de la enfermedad | 15 |
| Patogénesis de la infección | 16 |
| Epidemiología | 18 |
| El virión | 21 |
| Organización del genoma | 21 |
| Las Proteínas Virales | 23 |
| Ciclo de replicación viral | 26 |
| Control del dengue y estrategias de prevención | 27 |
| Estrategias para el control del dengue | 28 |
| Drogas antivirales | 29 |
| Vacunas de virus atenuados | 29 |
| Vacunas quiméricas recombinantes | 30 |
| | |
| Objetivos | 31 |
| Objetivo General | 31 |
| Objetivos Específicos | 31 |
| | |
| Capítulo 1. Construcción de herramientas genéticas para estudiar la replicación del virus del dengue | 32 |
| Introducción | 32 |
| Uso de los clones infecciosos para el desarrollo de vacunas | 32 |
| Uso de los clones infecciosos para entender la patogenia y la replicación del virus del dengue | 33 |
| Generación de replicones y virus reporteros utilizando clones infecciosos | 34 |
| Resultados | 36 |
| 1) Desarrollo de virus del dengue que expresan proteínas reporteras | 36 |
| Desarrollo de virus reporteros bicistrónicos | 36 |
| El virus DV-R permite diseccionar las distintas etapas de la replicación viral | 37 |
| El virus DV-R es una herramienta útil para determinar el modo de acción de antivirales | 39 |
| Desarrollo de virus reporteros monocistrónicos | 40 |
| Los virus reporteros monocistrónicos replican eficientemente en células de mamífero | 41 |
| El tamaño del gen reportero afecta negativamente la encapsidación viral | 42 |
| El virus reportero mDV-R permite diseccionar las distintas etapas de la replicación viral | 42 |
| El virus reportero mR-DV replica en células blanco de una infección natural | 44 |
| Cinética de replicación del DV-R y el mDV-R | 45 |
| El virus mDV-R permite realizar estudios de trans-complementación genética | 46 |
| Desarrollo de un virus reportero monocistrónico que expresa GFP | 47 |
| El virus mDV-GFP es una herramienta útil para la realización de ensayos en formato de gran escala | 48 |
| 2) Secuenciación y construcción del primer clon infeccioso de dengue argentino | 50 |
| Secuenciación completa del genoma de DENV de un aislamiento de Salta | 50 |
| Análisis filogenético del aislamiento DENV de Salta | 50 |
| Desarrollo de un clon infeccioso de dengue local | 51 |
| El Clon Salta produjo partículas virales infectivas eficientemente | 53 |
| El Clon Salta posee una cinética lenta de replicación del RNA | 56 |
| Discusión | 58 |

| | |
|--|-----|
| Capítulo 2. Función de la N-glicosilación de la proteína de envoltura y pre-membrana del virus del dengue | 61 |
| Introducción..... | 61 |
| Resultados..... | 63 |
| 1) Función de la N-glicosilación de la proteína de envoltura del virus del dengue | 63 |
| Rol de la N-glicosilación de la proteína E del virus del dengue en células de mosquito..... | 63 |
| Requerimiento de la N-glicosilación de E para la replicación del virus del dengue en células de mamífero..... | 65 |
| El glicano en la posición N67 de la proteína E es necesario para la producción de partículas virales en células de mamífero..... | 66 |
| La ablación del glicano 153 en la proteína E reduce la infectividad del virus..... | 68 |
| La N-glicosilación en el sitio N67 tiene un rol en la propagación viral en células de mamífero..... | 69 |
| Los virus N67Q mostraron una infectividad reducida..... | 70 |
| La mutación N67Q impide la secreción de la proteína E en células de mamífero..... | 71 |
| El virus reportero permite caracterizar defectos en la replicación del virus N67Q..... | 72 |
| La glicosilación de la proteína E en la posición 67 incrementa la entrada viral en células que expresan DC-SIGN..... | 74 |
| 2) Función de la N-glicosilación de la proteína prM del virus del dengue | 76 |
| Requerimiento de la N-glicosilación de la proteína prM en la replicación del virus del dengue en células de mosquito y mamífero..... | 76 |
| La mutación N69Q afecta la producción de la proteína prM..... | 77 |
| La mutación N69Q afecta la formación o salida de las partículas virales..... | 77 |
| Discusión..... | 79 |
| | |
| Capítulo 3. Identificación de proteínas de la célula hospedadora involucradas en la replicación del virus del dengue | 84 |
| 1) Screen genético mediante RNA de Interferencia | 85 |
| Introducción..... | 85 |
| Resultados..... | 85 |
| Puesta a punto del virus reportero para formato de gran escala..... | 85 |
| Screen primario..... | 87 |
| Screen Secundario..... | 89 |
| Implicancia de las quinasas EPIIB2, CDC42BPA y MAP4K5 en las distintas etapas del ciclo de replicación del virus..... | 91 |
| Validación de las quinasas candidatas utilizando otras metodologías..... | 93 |
| CDC42BPA/MRCK..... | 93 |
| EPHB2..... | 95 |
| MAP4K5/GCKR/KHS..... | 95 |
| 2) Interacción del virus del dengue con los lipid droplets | 98 |
| Introducción..... | 98 |
| Resultados..... | 100 |
| La proteína ADRP es desplazada de los LDs durante la infección viral..... | 100 |
| ADRP es un factor negativo para la replicación del virus del dengue..... | 102 |
| Asociación de la vía COPI en el transporte de la proteína de cápside a los lipid droplets..... | 104 |
| La Brefeldina A tiene un efecto negativo sobre la producción viral..... | 105 |
| La proteína de cápside es transportada a los lipid droplets a través de la vía GBF1-ARF1-COPI..... | 105 |
| Discusión..... | 107 |
| Screen genético mediante RNA de Interferencia..... | 107 |
| Interacción de la proteína de Cápside con lipid droplets..... | 109 |
| | |
| Conclusión general | 112 |
| | |
| Materiales y métodos | 114 |
| 1) Generación de herramientas genéticas | 114 |

| | |
|--|------------|
| Clon infeccioso de Salta | 114 |
| Virus reporteros bicistrónicos | 114 |
| Virus reporteros monocistrónicos | 115 |
| Generación de virus mutantes de N-glicosilación | 116 |
| Construcción de los plásmidos de expresión de sE de DENV | 116 |
| 2) Cultivo de células y análisis de la replicación viral | 117 |
| Medios de cultivo y líneas celulares | 117 |
| Plásmidos | 117 |
| Stocks virales | 118 |
| Anticuerpos | 118 |
| Compuestos | 118 |
| Preparación de moldes de DNA para el ensayo de transcripción <i>in vitro</i> | 118 |
| Síntesis de RNA genómico por transcripción <i>in vitro</i> | 119 |
| Transfección de RNAs genómicos y producción de virus | 119 |
| Infección viral | 119 |
| Ultracentrifugación de stocks virales | 120 |
| Medida de actividad luciferasa | 120 |
| Medida de fluorescencia | 120 |
| Ensayo de citotoxicidad | 120 |
| Transfección de RNAs de interferencia | 120 |
| Screens de RNAs de interferencia de gran escala | 121 |
| Aislamiento de RNA viral, RT-PCR y secuenciación | 122 |
| PCR en tiempo real | 122 |
| Experimentos de caza y captura, expresión y detección de las proteínas sE recombinantes | 123 |
| Inmunofluorescencia y microscopía | 123 |
| Ensayos de unidades formadoras de placas de lisis | 124 |
| Curvas de crecimiento viral | 124 |
| Tratamiento con glicosidasas | 125 |
| Ensayo de radioinmunoprecipitación | 125 |
| Citometría de flujo | 125 |
| Apéndice | 127 |
| Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Las secuencias se encuentran en sentido 5'-3'. | 127 |
| Referencias bibliográficas | 128 |

Abreviaturas

| | |
|--------|---|
| BFA | brefeldina A |
| cDNA | DNA copia |
| CST | castanospermina |
| DC | célula dendrítica |
| DENV | virus del dengue |
| DF | fiebre por dengue |
| DHF | fiebre hemorrágica por dengue |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| DNJ | deoxynojirimicina |
| E | proteína de envoltura |
| EMCV | virus de la encefalomiocarditis |
| ER | retículo endoplasmático |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| FMDV2A | proteasa 2A del virus de la fiebre aftosa |
| GFP | proteína verde fluorescente |
| HCV | virus de la hepatitis C |
| hpi | horas post-infección |
| hpt | horas post-transfección |
| IF | inmunofluorescencia |
| IP | inmuno-precipitación |
| IRES | sitio de entrada interno del ribosoma |
| JEV | virus de la encefalitis japonesa |
| LD | lipid droplet |
| MOI | multiplicidad de infección |
| mRNA | RNA mensajero |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPS | Organización Panamericana de la Salud |
| ORF | marco abierto de lectura |
| pb | pares de bases |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| PFU | unidades formadoras de placas |
| prM | proteína de pre membrana |
| RNA | ácido ribonucleico |
| RT | reacción de la transcriptasa reversa |
| sE | fragmento soluble de la proteína E |
| SFV | virus semliki forest |
| siRNA | pequeños RNAs de interferencia |
| UTR | región no codificante |
| WB | western blot |
| WNV | virus del Nilo Occidental |
| WT | tipo salvaje |
| YFV | virus de la fiebre amarilla |

Introducción general

El Virus del Dengue

El virus del dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae*, la cual contiene tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*. Los miembros de esta familia son virus de RNA de simple cadena y polaridad positiva, que poseen similitudes a nivel de su organización genómica, morfología de los viriones y estrategias de replicación.

El género *Flavivirus* contiene cerca de 80 virus envueltos, tanto humanos como de animales. De acuerdo a su ecología, los flavivirus son llamados arbovirus, lo que denota que sus miembros son transmitidos a los hospedadores vertebrados por insectos, en su mayoría mosquitos o garrapatas.

Muchos flavivirus han sido asociados con enfermedades humanas e incluyen algunos patógenos humanos importantes, como el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV) y el virus del Nilo Occidental (WNV).

Dentro de los flavivirus transmitidos por mosquitos se encuentran los cuatro serotipos de DENV (DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4). Puesto que los cuatro virus son antigénicamente y genéticamente distintos, se los considera como cuatro especies distintas de virus relacionados entre sí, que causan enfermedades similares en humanos (Lindenbach B. 2007; Halstead 2008).

Origen

Los primeros reportes de epidemias con síntomas similares a los de dengue ocurrieron en Asia, África y América del Norte en 1779 y 1780. Sin embargo, existen reportes de enfermedades con síntomas similares a los de dengue durante la primera Dinastía China (265-420 DC).

El origen de la palabra dengue proviene del Swahili, durante las epidemias en África en los años 1823 y 1870. Allí, la enfermedad fue llamada *Kidinga pepo*, la cual se refería a una parálisis causada por un mal espíritu. Luego fue llamada *dunga* en Cuba durante la epidemia de 1828, y luego cambió a dengue, como es conocida hoy en día.

La transmisión de la enfermedad a través de los mosquitos *Aedes* fue demostrada en el año 1903, aislándose el virus por primera vez en 1944 (Christie 1872; Gubler 2006).

Transmisión del virus del dengue

El ciclo de infección del DENV involucra humanos y mosquitos del género *Aedes*. Dentro de este género, el vector primario más importante es el *Aedes aegypti*, pero también los mosquitos *Aedes albopictus* y *Aedes polynesiensis* pueden transmitir el virus, lo cual depende del área de distribución geográfica del vector. Los mosquitos *Aedes* habitan en áreas tropicales o subtropicales (WHO 2009). Sin embargo, la distribución histórica del mosquito no es estática, y la re-emergencia de la enfermedad ha abierto el debate acerca del rol del cambio climático en el aumento de la distribución del mosquito y la re-emergencia de las epidemias de dengue (Jansen and Beebe 2010).

El ciclo de transmisión más importante desde el punto de vista sanitario, es el ciclo urbano que involucra huéspedes humanos en los grandes centros urbanos de las áreas tropicales y subtropicales. Sin embargo, existe otro ciclo de transmisión zoonótico o selvático, que involucra primates como huéspedes no humanos y diferentes especies de mosquitos del género *Aedes* como vectores. Sin embargo, la importancia del ciclo selvático es menor para la transmisión del DENV, ya que éste se ha adaptado y puede mantenerse en un ambiente humano/doméstico (Weaver and Vasilakis 2009; WHO 2009).

La infección con DENV se produce cuando un mosquito *Aedes* infectado, pica y se alimenta de la sangre de una persona sana. Al contrario de lo que ocurre con otras especies de mosquito, generalmente esto ocurre durante las horas diurnas (Jansen and Beebe 2010).

Luego de que una persona es picada existe un período de incubación intrínseco o de incubación de la enfermedad, el cual dura entre 4 a 10 días. Pasado este período, la persona puede experimentar fiebre acompañada de una variedad de signos y síntomas no específicos, aunque la mayoría de las infecciones son asintomáticas o sub-clínicas. El virus replica en los nódulos linfáticos locales e hígado, liberándose luego por la sangre para infectar leucocitos y otros tejidos linfáticos. Durante el período febril agudo, tiempo durante el cual el virus puede circular por la sangre (viremia), si un mosquito sano pica a una persona enferma se infectará (Figura 1).

El virus se multiplica en las células del intestino del mosquito hembra infectado, para luego pasar a la hemolinfa y otros tejidos del insecto. Una vez que las glándulas salivales son infectadas, el mosquito es capaz de transmitir el virus a través del fluido salival, cuando pique a una persona sana.

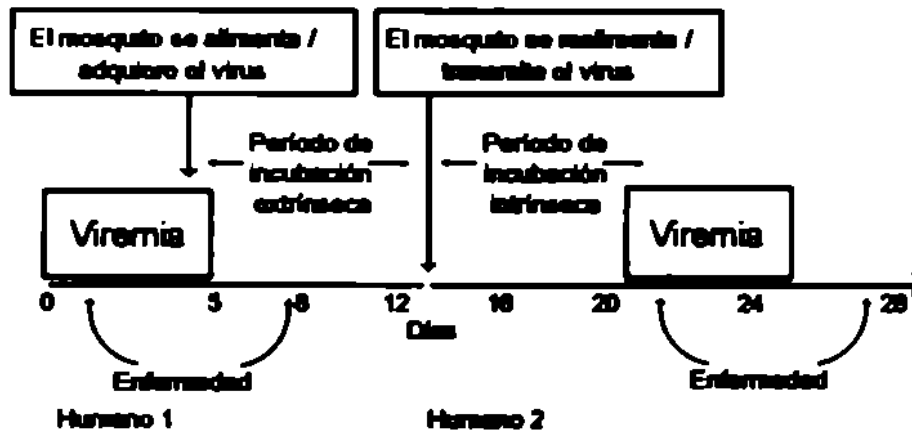


Figura 1. Ciclo de transmisión del virus del dengue por el mosquito *Aedes aegypti*. Modificado de (Lindenbach B. 2007).

El tiempo que transcurre desde la infección de un mosquito, hasta que las glándulas salivales son infectadas y este puede transmitir el virus, es llamado **período de incubación extrínseco**. Este período demora de 8 a 14 días, dependiendo de la temperatura del ambiente y de la cepa viral. Luego de esta etapa, el mosquito permanece infectado por el resto de su vida (WHO 2009).

El mosquito tiene hábitos urbanos, por lo que la puesta de huevos la realiza en contenedores artificiales comúnmente encontrados en los hogares, tales como: neumáticos abandonados, floreros, tanques de agua, y cualquier otro recipiente con agua clara. Las hembras de *Aedes aegypti* generalmente se alimentan de varias personas durante un mismo día, y si están infectadas, transmiten el virus a muchas personas en un corto período de tiempo. (WHO 2009; Jansen and Beebe 2010)

Varios estudios han demostrado la existencia de transmisión trans-ovárica o vertical del DENV en mosquitos hembra infectados, lo que permite la propagación del virus a la progenie. Sin embargo, la significancia de la transmisión vertical para el mantenimiento del virus en poblaciones naturales todavía no es bien entendida (Gunther, Martinez-Munoz et al. 2007; WHO 2009).

Características clínicas de la enfermedad

La enfermedad del dengue presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas, muchas veces impredecibles en su evolución y resultados. Sin embargo, pueden distinguirse tres fases luego del período de incubación: febril, crítica y de recuperación (WHO 2009).

Fase febril: por lo general, esta fase febril aguda dura de 2 a 7 días y suele acompañarse de enrojecimiento facial, eritema, dolor corporal generalizado, mialgias, artralgias, cefalea y dolor retro ocular. En la fase febril temprana, puede ser difícil distinguir clínicamente el dengue de otras enfermedades febriles agudas. Además, estas características clínicas son indistinguibles entre los casos de fiebre por dengue y los de dengue grave.

Fase crítica: se da cuando empieza a disminuir la fiebre; la temperatura desciende a 37,5 °C o menos y se mantiene por debajo de este nivel. Esto ocurre en los primeros 3 a 7 días de la enfermedad. El aumento de la permeabilidad capilar y los niveles del hematocrito marcan el inicio de la fase crítica. El período de extravasación de plasma, clínicamente y por lo general, dura de 24 a 48 horas. Puede asociarse con hemorragia de las mucosas nasales. En este punto, los pacientes sin un gran aumento de la permeabilidad capilar mejoran, mientras que aquellos con mayor permeabilidad capilar pueden empeorar como resultado de la pérdida de volumen plasmático. El *shock* por dengue ocurre cuando un volumen crítico de plasma se pierde por extravasación.

Fase de recuperación: cuando el paciente sobrevive a la fase crítica, (la cual no excede las 48 a 72 horas), pasa a la fase de recuperación. Ésta se caracteriza por una reabsorción gradual del líquido extravasado, el cual regresa del compartimiento extravascular al intravascular. Hay una mejoría del estado general, se estabiliza el estado hemodinámico y se incrementa la diuresis. El hematocrito se estabiliza o puede ser menor debido al efecto de dilución del líquido reabsorbido.

Clasificación de la enfermedad

La infección por dengue es una enfermedad sistémica y dinámica. Tiene un amplio rango de manifestaciones clínicas, que van desde formas severas hasta formas no severas. Mientras la mayoría de los pacientes se recuperan, una pequeña proporción progresa hacia cuadros más severos de la enfermedad. Clínicamente es muy difícil predecir si un paciente va a progresar hacia una forma más severa de la enfermedad. Este es un punto importante, ya que un tratamiento apropiado y a tiempo puede prevenir el desarrollo de cuadros más graves de la enfermedad.

En la clasificación más conocida de la enfermedad, las infecciones sintomáticas de dengue fueron agrupadas en tres categorías: fiebre indiferenciada, fiebre por dengue (DF) y fiebre hemorrágica por dengue (DHF). La DHF fue dividida a su vez en cuatro grados de severidad, siendo los grados III y IV definidos como síndrome de shock por dengue (DSS) (WHO 1997). Sin embargo, esta clasificación presentó dificultades en la aplicación de

definir la DHF en una situación clínica. Además, fueron reportados casos severos de dengue que no cumplían todos los criterios de la DHF (Bandyopadhyay, Lum et al. 2006). Por esta razón, la OMS ha sugerido la clasificación del dengue de acuerdo al grado de severidad. Así, de esta manera la enfermedad ha sido clasificada en *dengue con o sin signos de alarma*, y *dengue severo*. Para cada una de estas categorías ha sido elaborada una serie de criterios clínicos para evaluar el estado del paciente y para facilitar la toma de decisiones (WHO 2009) (Figura 2).

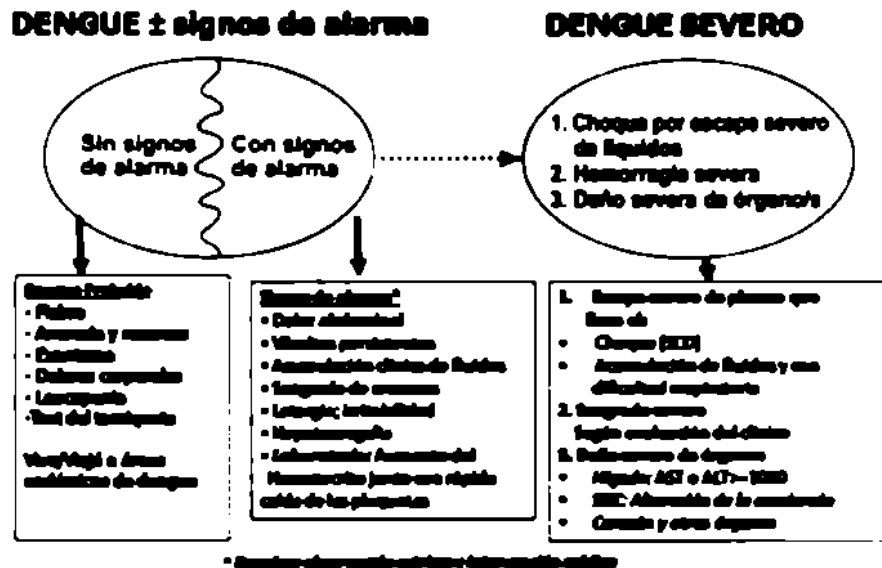


Figura 2. Clasificación revisada del dengue. Modificado de (WHO 2009).

Patogénesis de la Infección

Si bien todos los serotipos de DENV pueden causar fiebre por dengue, ésta es una enfermedad autolimitada, por lo que sólo entre un 1-5% de los pacientes pueden experimentar cuadros clínicos más complicados, como hemorragias y choque por dengue. Por esta razón, la aparición de formas más severas de la enfermedad se encuentra asociada con diferentes factores de riesgo, como son la virulencia viral, el estado inmunológico y factores genéticos del paciente, así como la re-infección con otros serotipos de DENV (Malavige, Fernando et al. 2004; Clyde, Kyle et al. 2006; Rodenhuis-Zybert, Wilschut et al. 2010).

A pesar de que no ha sido posible establecer una clara correlación entre la severidad de la enfermedad y un particular serotipo o genotipo de DENV, existen evidencias de que algunos genotipos de DENV2 y DENV3 están más asociados con formas hemorrágicas de la enfermedad. En general, los genotipos Asiáticos parecen ser más virulentos que genotipos Americanos y del Pacífico Sur. En el caso del DENV2, análisis filogenéticos muestran que

los genotipos Americanos fueron asociados con DF, mientras que los genotipos Asiáticos correlacionaron con DHF (Rico-Hesse, Harrison et al. 1997; Messer, Gubler et al. 2003).

Durante la infección por DENV, la inmunidad innata del individuo juega un rol clave en determinar la severidad de la enfermedad, particularmente durante la infección primaria. Así, se ha demostrado que en ratones deficientes para los receptores de IFN- α/β y IFN- γ el virus replica a niveles muchos más altos que en ratones salvajes, siendo además mucho más susceptibles a la enfermedad (Johnson and Roehrig 1999). Asimismo, en estudios clínicos se observó un mayor nivel del IFN circulante en pacientes enfermos respecto a personas sanas (Kurane, Innis et al. 1993). El hecho de que se hayan medido mayores niveles de IFN- γ en pacientes enfermos que sobrevivieron a la enfermedad, respecto a pacientes que no sobrevivieron, sugiere que la respuesta a interferón tiene un efecto protector contra la enfermedad (Chen, Lei et al. 2006).

La característica principal de la patogénesis de las formas más severas de dengue, es la pérdida de la integridad endotelial, la cual se postula que se debe a una anormal respuesta inmune en contra del virus. Estudios clínicos han demostrado que los niveles de citoquinas e inmuno-moduladores como TNF- α , interleuquinas, IFN- α e IFN- γ , se incrementaron en pacientes con formas graves de la enfermedad. Además, el rol de las citoquinas en el aumento de la permeabilidad vascular está apoyado por estudios en modelos murinos. Esta respuesta de citoquinas, estaría dada por la activación de linfocitos T por las células monocíticas infectadas (Rodenhuis-Zybert, Wilschut et al. 2010).

La infección con uno de los serotipos de DENV resulta en la Inmunidad de sólo ese serotipo, ya que la respuesta inmune para el serotipo primario es sólo protectora contra todos los serotipos durante los primeros meses después de la infección. Además, se ha observado que una segunda infección de DENV con un serotipo distinto, aumenta el riesgo de desarrollar formas severas de la enfermedad. Este fenómeno es conocido como aumento de la infección dependiente de anticuerpos (ADE, *Antibody dependent enhancement*). Este modelo postula que los anticuerpos heterólogos adquiridos en una infección primaria, reconocen al virus de un serotipo diferente durante una infección secundaria. Así, formarían un complejo antígeno/anticuerpo, el cual se internalizaría a células monocíticas mediante receptores para el fragmento Fc del anticuerpo. Debido a que el anticuerpo es heterólogo, el virus no es neutralizado y es capaz de replicar en estas células, aumentando la infección y replicación del DENV en las células del sistema mononuclear fagocítico. Esto llevaría a un aumento en la carga viral y eventualmente a un agravamiento de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de que numerosos estudios han

confirmado que la infección secundaria es un importante factor de riesgo, existen casos de DHF asociados sólo con infecciones primarias. Por lo contrario, sólo entre un 2-4% de los individuos con una infección secundaria, desarrollaron formas más severas de la enfermedad (Malavige, Fernando et al. 2004; Clyde, Kyle et al. 2006; Rodenhuis-Zybert, Wilschut et al. 2010).

Por todo esto, a pesar del descubrimiento de varios factores del huésped y del virus que predisponen a formas más severas de la enfermedad, la complejidad de estas interacciones durante una infección natural hacen difícil explicar y predecir la patogénesis de ésta.

Epidemiología

A partir de descripciones clínicas antiguas se sabe que a partir del siglo III DC ocurrieron enfermedades con síntomas similares al dengue. Estos reportes llamaban a la enfermedad como "agua envenenada" debido a la asociación entre los mosquitos y la manifestación de la enfermedad. Sin embargo, recién entre los años 1779-1788 se tienen las primeras evidencias de la gran distribución de una enfermedad con síntomas muy parecidos a los de dengue, en países de África, Asia y América (Weaver and Vasilakis 2009).

La fiebre hemorrágica por dengue emergió como un problema de salud pública en 1954, cuando la primera epidemia de este tipo ocurrió en Manila, Filipinas. Esta se produjo por el establecimiento de un cuadro endémico con co-circulación de distintos serotipos de DENV. Esto fue posible por el incremento del movimiento de individuos como consecuencia del aumento en las comunicaciones y el tráfico aéreo internacional. Luego, en los años siguientes, la enfermedad se diseminó a otros países de la región (Malavige, Fernando et al. 2004; Weaver and Vasilakis 2009).

Grandes epidemias ocurrieron en otras partes del mundo en las décadas de 1980 y 1990, y fueron causadas por los cuatro serotipos de dengue. En 1998 se registró una pandemia de dengue, donde 1.2 millones de casos de fiebre por dengue y dengue hemorrágico fueron reportados en 56 países (Malavige, Fernando et al. 2004).

Al presente, el dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos más importante del mundo. En los últimos 50 años la incidencia de la enfermedad se ha incrementado, siendo en la actualidad endémica en 112 países. Se estima que 50 millones de infecciones por dengue ocurren anualmente y aproximadamente 2500 millones de personas viven en países endémicos (Figura 3). En el año 2005 la OMS incluyó al dengue como un ejemplo de enfermedad que podría constituir una emergencia de salud pública internacional, con

implicaciones para la seguridad social. Esto fue como consecuencia de la rápida diseminación de las epidemias más allá de los límites internacionales (WHO 2009).



Figura 3. Países y áreas con riesgo de transmisión de dengue (2008). Las líneas rojas indican los límites geográficos potenciales en los cuales el *Aedes aegypti* puede llevar a cabo su ciclo de replicación. Las regiones marcadas en rojo, corresponden a países o áreas en riesgo. Modificado de WHO, 2009.

A pesar de que las epidemias de fiebre por dengue son conocidas desde hace más de 200 años, las razones del resurgimiento de las epidemias de fiebre por dengue y dengue hemorrágico no son muy claras. El crecimiento descontrolado de la población, la urbanización no planeada, la falta de sistemas de distribución de agua, y la ausencia de programas efectivos para el control del mosquito, han sido implicados en el aumento de la distribución y la densidad del vector y también el incremento de la diseminación del virus (Malavige, Fernando et al. 2004).

En América, el programa para la erradicación del *Aedes aegypti* para combatir las epidemias de fiebre amarilla, llevó al control del DENV en el continente por los siguientes 20 años. Sin embargo, el abandono de este programa durante la década de 1970, llevó a una gradual re-infestación por el mosquito y produjo importantes epidemias de dengue en el Caribe, América Central y América del Sur. Desde esa época, la fiebre por dengue se ha diseminado en el continente, con epidemias cíclicas cada 3-5 años. El aumento de la actividad epidémica condujo al desarrollo de la hiperendemicidad y a la aparición de formas severas de la enfermedad (WHO 2009). El dengue hemorrágico surgió por primera vez en el continente en Cuba en el año 1981, y luego en otros países americanos (Kouri, Guzman et al. 1986).

Entre los años 2001-2007, más de 30 países americanos notificaron más de cuatro millones de casos de dengue, con un número de casos de DHF de 106.037, y siendo 1299 la cantidad de casos fatales (OPS 2008). Solamente durante el primer semestre del año 2009,

según los registros de la OPS, en la región de las Américas se contabilizaron 33 países afectados, 556.445 casos de dengue confirmados y 198 fallecidos (OPS 2009).

En Argentina, el primer brote de dengue documentado ocurrió en las provincias de Corrientes y Entre Ríos, en el año 1916. Luego de un segundo brote en la ciudad de Rosario y la región Mesopotámica en el año 1926, la enfermedad no fue detectada en los siguientes 70 años. Así, en el año 1998 ocurrió nuevamente un brote causado por DENV2 en la región Chaco-Salteña, con el epicentro en Tartagal, con cientos de casos de fiebre por dengue. Este fue tan solo el principio, ya que luego ocurrieron numerosos brotes de dengue en el país, en los años 1998, 2000, 2002, 2003, 2004, 2006, 2007, 2008 y 2009. Tres serotipos de DENV han sido detectados en el país (DENV2, DENV3 y DENV4) desde la primera epidemia, pero aparecieron simultáneamente en Salta en el año 2003. Desde el re-ingreso del virus a la Argentina, entre 1998 y hasta el 2008, se registraron 3451 casos confirmados de dengue, siendo un 14,7% de los casos importados. Las provincias que notificaron casos autóctonos fueron: Salta, Jujuy, Formosa, Corrientes y Misiones (Masuh 2008; Nación 2010).

Durante el primer semestre del año 2009 se produjo el mayor brote de dengue en la historia epidemiológica de la Argentina, registrándose oficialmente 26923 casos confirmados y el fallecimiento de 5 pacientes. La enfermedad se extendió a 14 provincias de la Argentina, 10 de las cuales no contaban con historia epidemiológica de dengue. La extensión del brote incluyó tanto áreas andinas de bajo riesgo para la transmisión de virus, tales como Catamarca y Tucumán, como así también casos autóctonos en los centros urbanos más poblados del país como la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y el Conurbano Bonaerense. Respecto de los determinantes que favorecieron el brote de dengue ocurrido, pueden nombrarse el aumento de la población vectorial y el incremento de las temperaturas medias constatadas en la región centro del país, las cuales favorecen la sobrevivencia de los vectores y acortan el periodo extrínseco del virus. Además, esto se suma a los macro-determinantes sociales, como la concentración de los casos en las áreas más pobladas del país y de mayores necesidades básicas insatisfechas, las condiciones desfavorables de salubridad, la escasa recolección de residuos, falta de cloacas y agua potable (Nación 2010).

La dinámica epidemiológica del dengue es compleja, sus determinantes son múltiples e involucran a más de un sector de la sociedad. Por esto, es necesario el trabajo precoz en la prevención de los riesgos, el control epidemiológico, mantener estrategias de información

de la enfermedad para la comunidad, sumado esto a la necesidad de mejorar las condiciones de salubridad de la población.

El virión

El DENV consiste en una partícula esférica de alrededor de 50 nm de diámetro rodeada por una envoltura lipídica. La superficie de las partículas contiene las proteínas virales de envoltura (E) y de membrana (M). La glicoproteína E, es el determinante antigénico más importante de las partículas virales, y media los procesos de entrada y de fusión durante la entrada del virus a la célula. La proteína M, producida durante la maduración de los nuevos virus dentro de la vía secretoria, consiste en un pequeño fragmento proteolítico producido a partir de la proteína precursora de pre-membrana (prM). Dentro de la envoltura lipídica, se encuentra la nucleocápside, la cual consiste en múltiples copias de la proteína de cápside (C) y un RNA genómico (Lindenbach B. 2007) (Figura 4).

La reconstrucción de la microscopía crioelectrónica de la partícula, muestra una configuración de cabeza-cola de 90 dímeros de la proteína E paralelos a la membrana lipídica, dando por resultados una simetría icosaédrica del virión (Zhang, Corver et al. 2003).



Figura 4. Crio-microscopía electrónica del virión del DENV. Modificado de (Mukhopadhyay, Kuhn et al 2005).

Organización del genoma

El genoma del DENV, consiste en una simple cadena de RNA de cadena positiva de casi 11 kb, con un extremo 5' con una estructura tipo cap. A diferencia de los demás mRNAs celulares, el extremo 3' no está poliadenilado. Los genomas codifican para un marco de lectura abierto simple (ORF), flanqueado por las regiones 5' y 3' no codificantes (UTR) de 100 y de 400 nucleótidos respectivamente. La traducción del ORF produce una larga poliproteína, la cual es procesada co y post-traduccionalmente en 10 proteínas maduras. Estas pueden ser clasificadas en estructurales, C, prM y E; y no estructurales, NS1, NS2A,

NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. Las proteasas de la célula huésped y virales son responsables del procesamiento de la poliproteína (Lindenbach B. 2007) (Figura 5).

La regiones 5'UTR y 3'UTR poseen secuencias complementarias y altamente conservadas, que median interacciones de larga distancia necesarias para la replicación del RNA (Khromykh, Meka et al. 2001; Alvarez, Lodeiro et al. 2005; Villordo and Gamarnik 2009). Además, una región del 5'UTR denominada SLA ha sido propuesta como la región promotora reconocida por la polimerasa viral durante la replicación del RNA, en un mecanismo que involucra la circularización del genoma (Filomatori, Lodeiro et al. 2006). Por otro lado, ha sido demostrado que la región 3'UTR tiene un rol en la síntesis del RNA viral (Alvarez, De Lella Ezcurra et al. 2005).

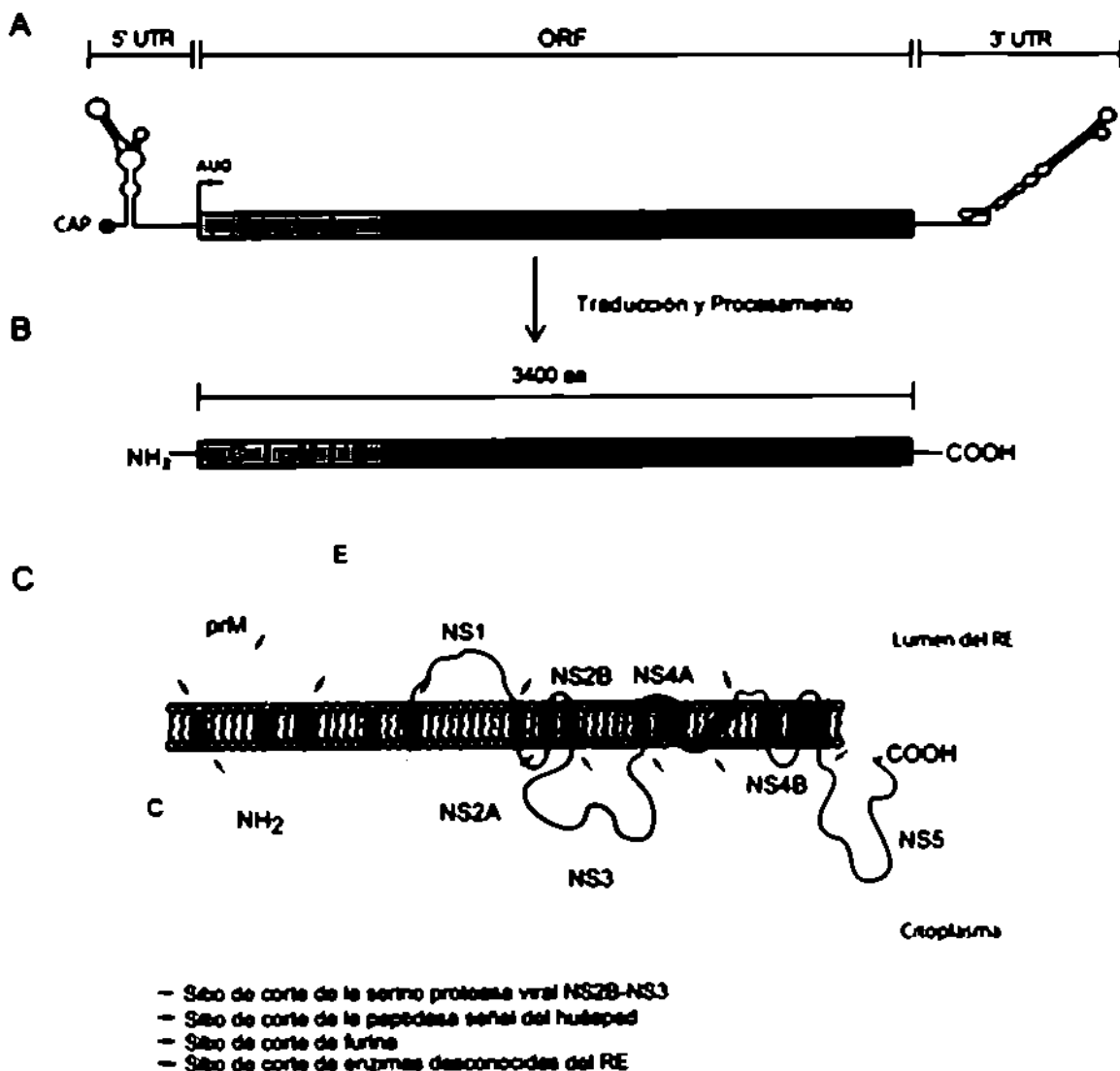


Figura 5. (A) Representación esquemática de la estructura genómica del DENV. (B) Representación esquemática de la poliproteína viral. (C) Topología de la poliproteína a ambos lados de la membrana del retículo endoplasmático. Las flechas indican los sitios de corte de proteasas virales y celulares.

Las Proteínas Virales

La **proteína C** es una proteína muy básica de aproximadamente 11 KDa, y forma un complejo ribonucleoproteico con el RNA genómico durante la encapsidación viral. Los residuos cargados están en el N y C-terminal, separados por una región hidrofóbica que media la asociación con membranas (Lindenbach B. 2007). La proteína C forma una estructura dimérica. Cada monómero está formado por cuatro alfa hélices. La estructura de C ha sido resuelta por RMN, lo que ha permitido elaborar un modelo de interacción del dominio básico de C con el RNA genómico y del dominio hidrofóbico con membranas (Ma, Jones et al. 2004).

La **glicoproteína precursora de membrana, prM** (26 KDa), contiene un sitio de N-glicosilación, y 6 residuos conservados de cisteína, los cuales están unidos por puentes disulfuro (Lindenbach B. 2007). La función principal de prM es formar heterodímeros con E. De esta forma previene que E adquiere una forma capaz de unirse a membranas durante su tránsito por la vía secretoria y asegura su correcto plegado (Wengler 1989; Heinz and Allison 2003; Zheng, Umashankar et al. 2010). Además, recientemente fue descrito que la presencia de prM en partículas virales inmaduras puede tener un rol en la patogénesis de la enfermedad, aumentando la infectividad durante infecciones secundarias con dengue (Rodenhuis-Zybert, van der Schaar et al. 2010).

La conversión de las partículas virales inmaduras a partículas maduras coincide con el procesamiento de prM en pr y M por la proteasa residente en el Complejo de Golgi, llamada furina (Stadler, Allison et al. 1997; Yu, Holdaway et al. 2009). Luego del procesamiento, los dímeros de prM-E se disocian, el fragmento pr es liberado y E forma homodímeros E-E (Stadler, Allison et al. 1997).

La **proteína de envoltura, E** (53 KDa), cubre la superficie de los viriones maduros y media la unión al receptor celular y la fusión de membranas durante el proceso de entrada a la célula. E contiene 12 cisteínas conservadas que forman puentes disulfuro, y de acuerdo a su estructura cristalina está N-glicosilada en las asparaginas 67 y 153. La estructura cristalina del fragmento soluble de la proteína E (sE) de DENV, fue determinada por cristalografía de rayos X a partir de complejos diméricos obtenidos con proteínas recombinantes expresadas en células S2 de *D. melanogaster* (Modis, Ogata et al. 2003; Modis, Ogata et al. 2004) (Figura 6).

La proteína forma homodímeros cabeza-cola, y cada monómero presenta tres dominios tipo lámina beta. El dominio I (DI) pertenece al N-terminal de la proteína, pero se encuentra ubicado en el centro de la estructura. El dominio II (DII) media la dimerización

de E y también incluye el péptido de fusión; este último presenta una secuencia altamente hidrofóbica y conservada, que media la fusión de las membranas del virus y la célula durante la infección.

El dominio III (DIII) tiene una estructura de inmunoglobulina y está involucrado en la unión de E al receptor celular. Además, es el blanco principal de los anticuerpos neutralizantes. La región C-terminal, ausente en las estructuras, se dirige hacia la membrana viral, de modo tal de anclar E al virión (Modis, Ogata et al. 2003; Modis, Ogata et al. 2004; Lindenbach B. 2007).

Durante la entrada viral, la exposición al pH ácido endosomal produciría una disociación de los dímeros de E, la que expondría al péptido de fusión hacia la membrana endosomal. En efecto, los dominios de E se reorientarían formándose trímeros de E y produciéndose la inserción del péptido de fusión en la membrana del endosoma celular. Finalmente, a través de la rotación y reubicación del DIII y un plegamiento del tallo de E se produciría la yuxtaposición de membranas y la formación del poro de fusión (Modis, Ogata et al. 2004).

La glicoproteína NS1 (46 KDa) es translocada dentro del Retículo Endoplasmático (ER) durante su síntesis. NS1 forma homodímeros estables y tiene una gran afinidad con membranas lipídicas (Lindenbach B. 2007). Tiene un rol todavía no muy claro en la replicación del RNA, sustentado por el hecho de que localiza en los sitios donde este proceso ocurre (Mackenzie, Jones et al. 1996). Virus mutantes para los sitios de N-glicosilación mostraron una disminución en la neurovirulencia en ratones. Además, el estudio de estos mutantes sugiere que NS1 puede influenciar el procesamiento y el transporte del virus (Crabtree, Kinney et al. 2005). NS1 también es secretada de la célula, por lo que durante la infección se produce una fuerte respuesta humoral en contra de esta proteína. Además, la inmunización con NS1 confiere protección contra el dengue (Falgout, Bray et al. 1990). Por esta razón se ha postulado que está involucrada en la patogenia de la enfermedad.

NS2A es una proteína pequeña e hidrofóbica (22 KDa). Su función estaría relacionada con la replicación del RNA y el ensamblado de las partículas virales (Mackenzie, Khromykh et al. 1998; Kummerer and Rice 2002). Además, se ha demostrado su rol inhibiendo la vía del Interferón Tipo I, actuando como antagonista de la misma (Munoz-Jordan, Sanchez-Burgos et al. 2003).



Figura 6. Estructura del dímero del fragmento soluble de E (sE) de DENV en el virión maduro. (A) Los tres dominios de sE del DENV: dominio I, rojo; dominio II, amarillo; dominio III, azul; tallo que une el fragmento sE con la región transmembrana de E, celeste; región transmembrana de E, celeste con rayas. (B) Conformación del dímero de sE. Las flechas rojas indican la ubicación del péptido de fusión. (C) Empaquetamiento de E en la superficie del virus. Modificado de (Modis, Ogata et al. 2004).

NS2B tiene tan solo 14 KDa, y se la encuentra asociada a membranas. Forma un complejo estable con NS3 y actúa como cofactor para la actividad serina-proteasa de NS2B-NS3, la cual es necesaria para el procesamiento de la poliproteína viral (Falgout, Pethel et al. 1991; Lindenbach B. 2007).

NS3 es una proteína multifuncional (70 KDa), implicada en la replicación del RNA viral. Además, de participar en la formación del complejo serina-proteasa, esta proteína tiene actividad de helicasa de RNA y de NTPasa (Gorbalenya, Koonin et al. 1989). Estas dos últimas funciones desempeñan un papel esencial en la replicación del RNA viral. Además, se ha observado que NS3 tiene un rol en el efecto citopático observado en células infectadas, vía una activación de los mecanismos apoptóticos (Shafee and AbuBakar 2003).

NS4A y NS4B son proteínas pequeñas e hidrofóbicas (16 y 27 KDa). Se encuentran ancladas a membranas y posiblemente involucradas en la replicación del RNA (Mackenzie, Khromykh et al. 1998). El corte de un fragmento en el C-terminal de NS4A induce el rearrreglo de membranas que tiene lugar luego de la infección viral (Miller, Kastner et al. 2007). NS4B ha mostrado ser un potente inhibidor del IFN α y β (Munoz-Jordan, Laurent-Rolle et al. 2005).

NS5 es una proteína grande y conservada (103 KDa) con actividad metiltransferasa y de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP). La región N-terminal de la proteína posee un dominio metil transferasa (MT) dependiente de S-adenosil-metilionina (SAM), el cual

transfiere grupos metilos durante la formación de la estructura tipo cap en el extremo 5' de los genomas virales (Egloff, Benarroch et al. 2002). El extremo C-terminal de NSS posee actividad polimerasa, necesaria para la síntesis de RNA durante la replicación (Bartholomeusz and Wright 1993). Se encuentra mayoritariamente en el núcleo de células infectadas, y en menor medida en los sitios de replicación del RNA viral en el citoplasma (Kapoor, Zhang et al. 1995). La localización nuclear de NSS ha sido relacionada con un efecto supresor de la respuesta antiviral celular (Pryor, Rawlinson et al. 2007).

Ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación comienza con la unión de los virus a receptores específicos ubicados en la superficie de la célula huésped (Figura 7). Esta unión se da a través de la interacción entre la proteína E y los receptores celulares. Gran cantidad de esfuerzo se ha invertido en tratar de identificar al receptor celular que media la entrada del DENV. Diferentes moléculas presentes en la superficie celular han sido propuestas como posibles receptores del virus, como los complejos de heparan sulfato (Hung, Lee et al. 1999) y las proteínas HSP70, HSP90, GRP78/Bip, CD14 y la 37/67-KDa high affinity laminin receptor (Salas-Benito and del Angel 1997; Martínez-Barragan and del Angel 2001; Jindadamrongwech, Thepparit et al. 2004; Thepparit and Smith 2004). Sin embargo, ninguna de ellas ha demostrado concluyentemente ser el receptor viral. De acuerdo con esto, nuevas observaciones muestran que la vía de entrada del virus a la célula puede depender tanto del tipo celular como del serotipo viral en cuestión (Acosta, Castilla et al. 2009).

Luego de la entrada del virus a la célula, el mismo ingresa a la vía endocítica, dirigiéndose a compartimientos endocíticos con bajo pH. Este ambiente ácido induce cambios estructurales en E que producen la fusión de las membranas viral y celular, lo que finalmente lleva a la liberación de las nucleocápside dentro del citoplasma. A continuación se produce el desnudamiento de la nucleocápside, quedando el genoma disponible para ser traducido en el citoplasma.

El genoma viral presenta polaridad positiva, por lo que es traducido directamente, asociado a membranas del ER. Las proteínas virales se producen como parte de una misma poliproteína, la cual es procesada co- y post-traduccionalmente tanto por proteasas virales como celulares, para producir las proteínas virales.

La replicación del RNA comienza con la síntesis de una cadena de RNA de polaridad negativa. Luego ésta es usada como molde para la síntesis de nuevas moléculas de RNA con polaridad positiva.

Trabajos realizados en nuestro laboratorio han identificado a la estructura SLA, ubicada en el extremo 5'UTR del genoma viral, como la estructura necesaria para el reconocimiento específico de la polimerasa viral NSS. Debido a que el SLA es suficiente para el pegado y la actividad polimerasa de NSS, es considerado el promotor para la síntesis de RNA viral. Sin embargo, el complejo SLA-NSS que se forma en el extremo 5' del genoma debe actuar en el extremo 3' del RNA. Al respecto, estudios en los que se emplearon sistemas *in vivo* e *in vitro* demostraron que la circularización del genoma es esencial para el acercamiento del extremo 3' al promotor SLA. De esta forma la polimerasa viral puede ser transferida del promotor al sitio de inicio de la síntesis de cadena negativa en el extremo 3' del genoma (Filomatori, Lodeiro et al. 2006).

El proceso de síntesis del RNA ocurre en complejos de replicación originados del ER llamados "vesicle packets" (VPs) (Mackenzie, Jones et al. 1996). Estos complejos incluyen la polimerasa viral (NSS), proteínas virales no estructurales y factores celulares. Dado que los VPs se encuentran conectados al citoplasma por un poro, y en cercanía a éstos se encontraron membranas del ER en asociación con partículas virales, se sugiere que los RNAs sintetizados en los VPs serían transportados hacia el ER donde ocurre la morfogénesis viral (Welsch, Miller et al. 2009).

El ensamblado del virión se produce en asociación con membranas intracelulares. Allí, las nuevas moléculas de RNA con polaridad positiva interactúan con la proteína C para formar las nucleocápsides. Luego éstas adquirirían la proteína E, por brotación desde la membrana del ER hacia el lumen del mismo. Las partículas virales inmaduras son transportadas en vesículas por la vía secretoria pasando por el aparato de Golgi. En este tránsito se produce la maduración de los viriones, que incluye el corte proteolítico de la proteína prM por la proteasa celular furina. Finalmente los nuevos virus son liberados de la célula por exocitosis (Clyde, Kyle et al. 2006; Lindenbach B. 2007; Rodenhuis-Zybert, Wilschut et al. 2010).

Control del dengue y estrategias de prevención

Hasta el momento no se dispone de vacunas ni terapias antivirales para el tratamiento de las infecciones por DENV. Los tratamientos sólo consisten en terapias paliativas para reducir las consecuencias de la fiebre, la deshidratación, la hipotensión y las hemorragias en el paciente.

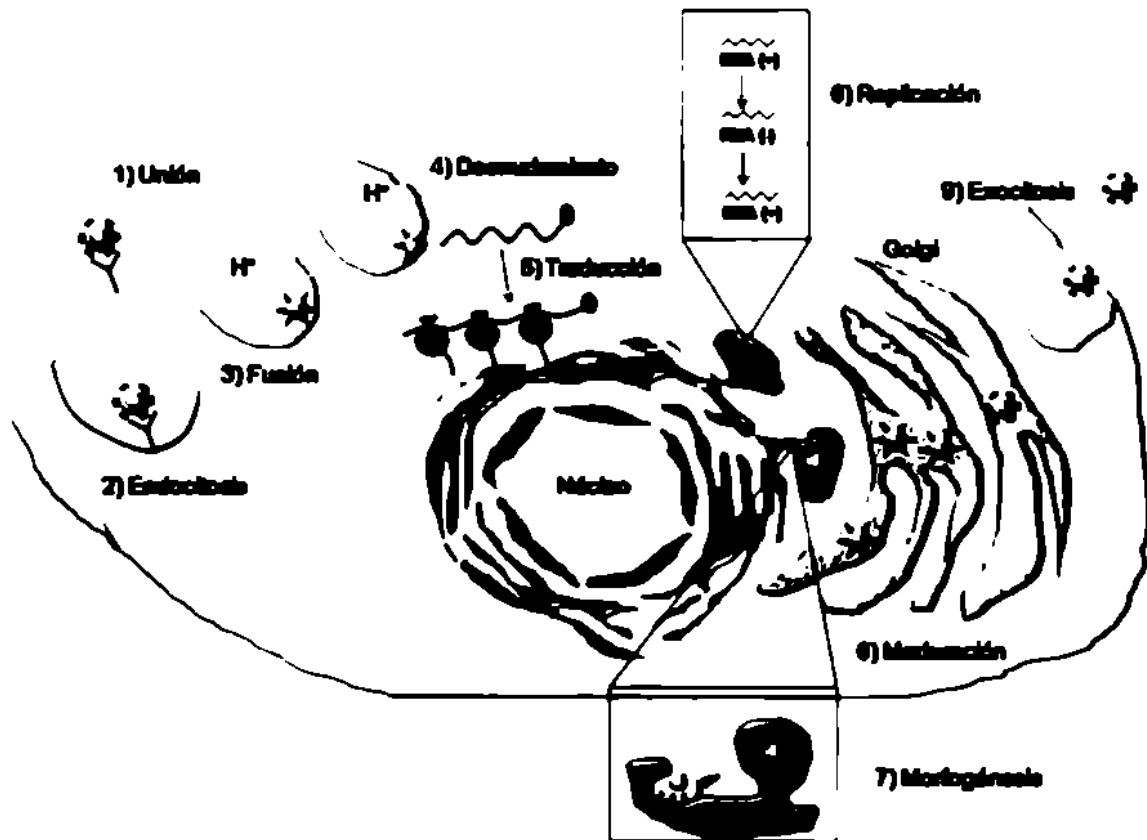


Figura 7. Ciclo de replicación del virus del dengue.

Para reducir o prevenir la transmisión del DENV, actualmente no existe otra alternativa que el control del vector. El control del *Aedes aegypti* requiere la combinación de distintos métodos basados en la aplicación de insecticidas para larvas y adultos. Sin embargo, el rociado con insecticidas para eliminar a los mosquitos adultos es generalmente poco efectivo. Por lo tanto, el modo más eficaz de controlar los mosquitos es la reducción de las larvas, eliminando o tratando químicamente los contenedores con agua que sirven como hábitat de las larvas en los ambientes domésticos.

Como consecuencia de las dificultades para controlar el vector y el aumento en la intensidad de las epidemias y los casos graves de dengue, se ha renovado el interés en el desarrollo de vacunas y métodos antivirales (Gubler 2006).

Estrategias para el control del dengue

La observación de que las formas graves de dengue están asociadas con una infección secundaria, hace necesario el desarrollo de una vacuna que induzca una respuesta inmune contra los cuatro serotipos del DENV. Por esta razón, el desarrollo de una vacuna contra el dengue es un desafío, ya que una vacuna segura debe proveer un delicado balance entre el

nivel de inmunogenicidad que produce y la atenuación de la patogenicidad. La inmunogenicidad inducida por la vacuna debe ser tal que el nivel de anticuerpos neutralizantes producidos sea lo suficientemente alto como para proveer una protección completa contra los cuatro serotipos, pero también lo suficientemente atenuada como para no producir patogenicidad o fallar en la inducción de una respuesta inmune efectiva. Así, la obtención de una vacuna segura, económica, de fácil aplicación y que proteja contra los cuatro serotipos DENV, se ha transformado en una prioridad de la salud pública mundial (Raviprakash, Defang et al. 2009; Murrell, Wu et al. 2011)

Actualmente existen distintas estrategias en desarrollo para el control del DENV, como el uso de drogas antivirales y el desarrollo de vacunas.

Drogas antivirales

Se ha observado que la cantidad de virus circulantes en pacientes que desarrollan formas graves de dengue es 10 o más veces mayor comparada con pacientes con formas no graves de la enfermedad. Esto sugiere que el beneficio potencial de una terapia antiviral podría ser la reducción de la carga viral, lo que a su vez podría disminuir la posibilidad de sufrir una forma grave de dengue (WHO 2009). Actualmente los blancos antivirales más avanzados son la proteasa NS2B/NS3 y la polimerasa NSS, proteínas con las cuales se han llevado a cabo *screens* con la finalidad de encontrar compuestos antivirales (Wilder-Smith, Ooi et al. 2010).

Con las nuevas tecnologías disponibles y mediante el uso de bibliotecas de compuestos, los esfuerzos para encontrar inhibidores específicos para el DENV se están intensificando, lo que podría llevar a una rápida transferencia de nuevos inhibidores a la clínica.

Vacunas de virus atenuados

Las vacunas de virus atenuados pueden inducir una respuesta inmune humoral y celular duradera, debido a que ellas pueden imitar a una infección natural.

Una estrategia empleada ha sido la atenuación de los cuatro serotipos de DENV mediante pasajes seriados de los virus en células de riñón de perro (PDK). Una dificultad que enfrenta esta estrategia está en el mantenimiento de la atenuación y la inmunogenicidad de cada uno de los componentes monovalentes, evitando que reviertan a una forma WT del virus. La vacuna tetravalente se encuentra actualmente en Fase II, con ensayos clínicos en voluntarios. Hasta ahora ha mostrado ser bien tolerada; induce una amplia respuesta antigénica y niveles moderados de anticuerpos neutralizantes (Murrell, Wu et al. 2011).

Vacunas quiméricas recombinantes

Otra estrategia para el desarrollo de vacunas contra el dengue consiste en la utilización de clones infecciosos. Una vacuna recombinante es construida mediante la utilización de un esqueleto genético de una cepa de DENV atenuada o de otro flavivirus, y reemplazando los genes de prM-E con los genes correspondientes de los cuatro serotipos de DENV. El objetivo es retener las propiedades del virus atenuado, e incorporar antigenicidad contra todos los serotipos de DENV.

Una vacuna en desarrollo es la que usa el clon infeccioso derivado del virus atenuado DENV2-PDK-53, obtenido a partir de pasajes seriados en células PDK. En este candidato vacunal, los genes de prM y E del clon infeccioso fueron reemplazados con los de los serotipos DENV1, DENV3 y DENV4. La vacuna tetravalente producida por combinación de los cuatro DENV quiméricos ha sido protectora cuando es administrada a ratones y monos, por lo que se planea realizar ensayos de Fase I en humanos (Huang, Butrapet et al. 2003).

Una segunda vacuna de virus quiméricos vivos, utiliza una cepa de DENV4 atenuada por una delección ($\Delta 30$) en la región 3'UTR. Las proteínas prM y E fueron reemplazadas en forma similar a como se hizo con el candidato vacunal. La vacuna quimérica mostró ser inmunogénica y tener a la vez una alta atenuación en monos, por lo que es posible que sea prontamente ensayada en una Fase I/II (Durbin, Whitehead et al. 2005).

La vacuna con el mayor grado de avance, es la vacuna quimérica entre DENV y YFV, desarrollada por Acambis y licenciada a Sanofi Pasteur. Esta vacuna usa los genes de la vacuna 17D de YFV como esqueleto, reemplazando los genes de prM-E para cada serotipo de DENV. La vacuna ha sido testeada en adultos, adolescentes y niños. Luego de recibir tres dosis, los voluntarios mostraron seroconversión contra los cuatro serotipos del virus. Si los ensayos clínicos Fase IIb/III que se están llevando a cabo son exitosos, es esperable que se pueda contar con una vacuna licenciada en los próximos cinco años (Gubler 2006; Raviprakash, Defang et al. 2009; WHO 2009; Guzman, Halstead et al. 2010; Wilder-Smith, Ooi et al. 2010; Murrell, Wu et al. 2011).

Objetivos

Objetivo General

Determinar factores virales y celulares involucrados en la interacción del virus con la célula.

Objetivos Específicos

- 1) Construir herramientas genéticas para investigar cada paso del ciclo de replicación del virus del dengue.
- 2) Estudiar el requerimiento de la glicosilación de las proteínas de envoltura y pre-membrana durante la replicación del virus del dengue.
- 3) Identificar proteínas de la célula hospedadora que son necesarias para la replicación del virus del dengue.

Capítulo 1. Construcción de herramientas genéticas para estudiar la replicación del virus del dengue

Introducción

El DENV posee un genoma de RNA, por lo que plantea un desafío para su estudio y manipulación. Debido a la imposibilidad técnica de realizar estudios de mutagénesis sobre estas moléculas, es necesaria la utilización de métodos de retro-transcripción. Para esto es fundamental la construcción de clones infecciosos que contengan los genomas completos de RNA en forma de cDNA. Mediante el uso de los clones infecciosos, el genoma del DENV puede ser manipulado por medio de un proceso llamado genética inversa. Este término se refiere a que el genoma de RNA del virus es clonado como cDNA en un plásmido, lo que permite propagarlo en bacterias. Durante el proceso de clonado, se coloca un promotor de un bacteriófago (como el promotor de T7) río arriba de la región 5'UTR del virus, y un sitio único para una enzima de restricción río abajo del 3'UTR. De esta manera, el clon infeccioso puede ser linealizado y servir como molde para la producción *in vitro* de transcritos de RNA. Los transcritos de RNA son esencialmente idénticos a los genomas virales, y pueden ser introducidos en células permisivas para la replicación viral. Esto es suficiente para iniciar el ciclo de replicación viral y poder recuperar virus infecciosos del medio de cultivo. Así, los clones infecciosos se han convertido en una herramienta esencial para el desarrollo de candidatos vacunales, para la búsqueda de antivirales, y para el entendimiento de la patogénesis y la replicación viral.

La construcción de clones infecciosos de cDNA que puedan propagarse establemente en bacterias ha sido muy difícil, tanto para el DENV como para otros flavivirus. Aparentemente, el cDNA del DENV por sí mismo, o productos de su traducción, son tóxicos para células de *E. coli*. Esto, muchas veces resulta en la inestabilidad del material genético, siendo comunes las pérdidas de secuencias de DNA o la inserción de secuencias foráneas dentro de los clones de cDNA. Este problema pudo ser salvado realizando el clonado del cDNA en plásmidos de bajo número de copias, vectores de levaduras tipo *shuttle*, o bácmidos (Gualano, Pryor et al. 1998; Puri, Polo et al. 2000; Suzuki, de Borba et al. 2007).

Uso de los clones infecciosos para el desarrollo de vacunas

Una de las estrategias tradicionales para el desarrollo de vacunas es la obtención de virus atenuados, los cuales podrían ser usados como vacunas vivas. A través de pasajes seriados en células en cultivo, han sido obtenidas nuevas cepas de virus atenuados para los cuatro

serotipos de DENV; las cuales se encuentran actualmente en la fase de pruebas clínicas en su formulación como vacuna tetravalente. El uso de clones infecciosos ha permitido inmortalizar estos virus atenuados y conocer la base genética de la atenuación, lo que puede mejorar las posibilidades de desarrollo de una vacuna segura y estable (Kroeger, Nathan et al. 2004; Guy and Almond 2008). Por ejemplo, fue posible determinar los cambios genéticos del candidato vacunal PDK-53, derivado de la cepa de DENV2 16681, los cuales producen una atenuación en humanos. El intercambio de fragmentos de secuencia entre el cDNA del clon 16681 y el clon de la cepa atenuada, en combinación con ensayos de mutagénesis sitio dirigida, fueron suficientes para identificar tres mutaciones que conferían atenuación en el candidato vacunal PDK-53 (Butrapet, Huang et al. 2000).

Uso de los clones infecciosos para entender la patogenicidad y la replicación del virus del dengue

La virulencia viral ha sido señalada como un factor determinante en la severidad de la enfermedad del dengue. A través del uso de clones infecciosos, en combinación con el análisis de secuencias de cepas aisladas de personas con cuadros de dengue severo, es posible encontrar cambios de secuencias asociados con un aumento de la patogenicidad viral. Por ejemplo, en estudios cuyo objetivo era estudiar la neurovirulencia del DENV en ratones, se realizaron intercambios entre los genes estructurales de cepas de DENV neurovirulentas y no virulentas, en combinación con análisis de secuencia y mutagénesis sitio dirigida. Estos estudios llevaron a la identificación de aminoácidos específicos que determinaban el fenotipo de neurovirulencia en ratones (Gualano, Pryor et al. 1998).

El uso de los clones infecciosos ha sido una herramienta fundamental para diseccionar procesos básicos en el ciclo de replicación del DENV. A través del empleo de la bioquímica y más tarde de la bioinformática, se ha logrado caracterizar las proteínas del virus y el análisis de múltiples secuencias de genomas del DENV respectivamente.

El uso de la genética inversa y la mutagénesis sitio específica, han permitido desarrollar de una forma bastante sencilla baterías de virus mutantes. Así, ha sido posible evaluar en experimentos en cultivo o utilizando modelos animales, las predicciones y el rol específico de las proteínas del DENV, así como de estructuras de RNA conservadas. Utilizando esta metodología, en esta tesis se muestra, la importancia de la N-glicosilación de las proteínas E y prM del DENV (Capítulo 3).

Generación de replicones y virus reporteros utilizando clones infecciosos

A través de la manipulación de los clones infecciosos ha sido posible eliminar los genes estructurales del genoma viral, resultando en la producción de RNAs subgenómicos también llamados replicones. Éstos son capaces de replicar autónomamente, pero no de generar virus. Además, la introducción de genes reporteros en los replicones en reemplazo de los genes estructurales, ha resultado una herramienta muy útil para monitorear la traducción y la replicación del RNA. Esto ha permitido el descubrimiento de regiones del genoma del DENV implicadas en la replicación viral (Alvarez, De Lella Ezcurra et al. 2005). Los replicones subgenómicos han resultado herramientas muy útiles para la búsqueda de compuestos antivirales, pudiendo determinarse si el compuesto actúa sobre la traducción o sobre la replicación del RNA viral (Puri, Polo et al. 2000; Puig-Basagoiti, Tilgner et al. 2006; Ng, Gu et al. 2007). También, la introducción de marcadores de selección en los replicones ha permitido la generación de líneas celulares estables, manteniendo a los replicones bajo la selección de un antibiótico (Jones, Davidson et al. 2005; Ng, Gu et al. 2007).

Una desventaja que presenta el empleo de los replicones estriba en la imposibilidad de utilizarlos para estudiar la entrada de la partícula viral, su desnudamiento dentro de la célula; y por último, los procesos de encapsidación del RNA y de formación o morfogénesis de la partícula viral. Estos impedimentos fueron parcialmente resueltos mediante el desarrollo de técnicas de trans-encapsidación. Mediante esta metodología, se obtienen partículas virales proporcionando a los replicones los genes de las proteínas estructurales en *trans*. Esta metodología permite utilizar a los replicones en rondas simples de infección, para estudiar el proceso de entrada y encapsidación (Ng, Gu et al. 2007; Lai, Hu et al. 2008; Qíng, Liu et al. 2010). De todas maneras, el empleo de la trans-encapsidación no permite el estudio de la propagación viral, ya que sólo es posible analizar una única ronda de infección. Además, no es posible estudiar el proceso de formación de la partícula viral. Por último, el estudio de la encapsidación en *trans*, plantea el problema de tener que expresar artificialmente los genes estructurales, exponiéndose a artefactos de la técnica.

Lo ideal, para el estudio de todas las etapas del ciclo viral, es contar con un virus reportero. Éste es un virus que tiene la particularidad de poseer su genoma completo, y alguna proteína reportera que permita seguir la replicación del mismo en función del tiempo.

Al comienzo de esta tesis no había sido publicado ningún virus reportero para DENV, pero sí para otros flavivirus, como JEV y WNV (Yun, Kim et al. 2003; Deas, Binduga-Gajewska et al. 2005; Pierson, Diamond et al. 2005; Puig-Basagoiti, Deas et al. 2005). En estos estudios

fueron clonados los genes reporteros de la proteína verde fluorescente (GFP) o genes de distintas luciferasas en la región 3'UTR de estos virus, río abajo del IRES del virus de la Ecefalomiocarditis (EMCV). De esta forma, se produjeron exitosamente virus infecciosos que conservaban la proteína reportera y permitían seguir la replicación viral a través de la medida de actividad luciferasa.

Resultados

1) Desarrollo de virus del dengue que expresan proteínas reporteras

Debido a que al comienzo de esta tesis no habían sido desarrollados DENV que expresasen proteínas reporteras, se planteó este objetivo, convencidos de que serían herramientas fundamentales para el estudio de la biología del virus y para la búsqueda de proteínas de la célula huésped involucradas en la replicación viral.

El desarrollo de un virus reportero plantea el problema de colocar en el genoma completo del virus un gen foráneo, evitando que no afecte en demasía la replicación del virus, y que éste sea capaz de encapsidar un genoma de mayor tamaño. Para esto es importante clonar el gen foráneo en regiones que no sean críticas para la replicación viral. Sin embargo, este es un punto complicado, ya que los virus en general y el DENV en particular, poseen genomas pequeños, con genes no redundantes, y con solapamiento de funciones.

Respecto al gen reportero, lo ideal es que sea pequeño (para no afectar la replicación del virus ni impedir la encapsidación del genoma), y que posea un *read out* lo más sensible posible. Esto último es importante para que el virus reportero pueda ser monitoreado durante todas las etapas del ciclo de replicación viral, y ser utilizado en formatos de gran escala o *high throughput*.

Desarrollo de virus reporteros bicistrónicos

Con el objetivo de desarrollar el primer virus reportero de DENV, se clonaron los genes de la luciferasa de Renilla y EGFP, río arriba de la región 3'UTR, y dirigidos por el IRES de EMCV. Estos virus fueron llamados bicistrónicos, debido a que tienen dos ORF, el viral y el del gen reportero, este último bajo control del IRES. Fue utilizado el gen de la luciferasa de Renilla (*Renilla reniformis*), en vez del gen de la luciferasa de Firefly (*Photinus pyralis*), debido a que el gen de la primera es de menor tamaño (933 pb y 1650 pb, respectivamente). De esta manera, se obtuvieron las construcciones DV-GFP y DV-R, con el gen de la GFP y el de la luciferasa de Renilla respectivamente (Figura 8A).

Se produjeron RNAs genómicos de ambas construcciones, y se transfectaron en células BHK. A los 3 días post-transfección se detectaron células positivas para GFP utilizando un microscopio de fluorescencia (Figura 8B). Con el objetivo de determinar si se producían virus infectivos, fueron utilizados sobrenadantes de estas células para infectar células frescas. A los 2 días post-infección se detectaron células positivas para GFP (Figura 8B).

Este resultado indica que el virus es capaz de replicar a pesar de tener un ORF foráneo, y que el IRES de EMCV dirige correctamente la expresión de GFP. Además, estos virus fueron capaces de encapsidar y de producir una progenie infectiva.

Los RNAs de la construcción DV-R fueron transfectados en células BHK en un formato de 24 pocillos. Con el fin de monitorear la replicación viral se midió la actividad luciferasa en función del tiempo. Para esto se utilizó un sustrato comercial y un luminómetro. Se detectó un incremento de la actividad luciferasa en función del tiempo, desde las 24 hasta las 120 hpt (Figura 8C). Fueron utilizados sobrenadantes de las células transfectadas para infectar células frescas. Se detectó actividad luciferasa desde las 2 hpi, incrementándose en función del tiempo hasta las 72 hpi.

Este último resultado revela que se están produciendo virus infectivos con el gen reportero. Además, el hecho de medir actividad luciferasa en etapas tempranas de la infección, sugiere que se está detectando la actividad del reportero producto de la traducción del RNA transfectado.

El virus DV-R permite diseccionar las distintas etapas de la replicación viral

Para caracterizar al virus reportero se utilizaron diferentes inhibidores que afectan distintas etapas de la replicación del DENV, con el fin de determinar la posibilidad de estudiar la replicación viral a través de la medida de la actividad luciferasa (Figura 9A).

Como inhibidor de la entrada viral se utilizó el compuesto heparina, el cual es un homólogo estructural de los heparan sulfatos de los proteoglicanos celulares, los cuales facilitan la entrada del DENV en ciertos tipos celulares (Chen, Maguire et al. 1997). El agregado de heparina al tiempo de la infección produjo niveles de actividad luciferasa similares al control sin infectar, sugiriendo que el compuesto inhibió por completo la entrada del virus a la célula (Figura 9A).

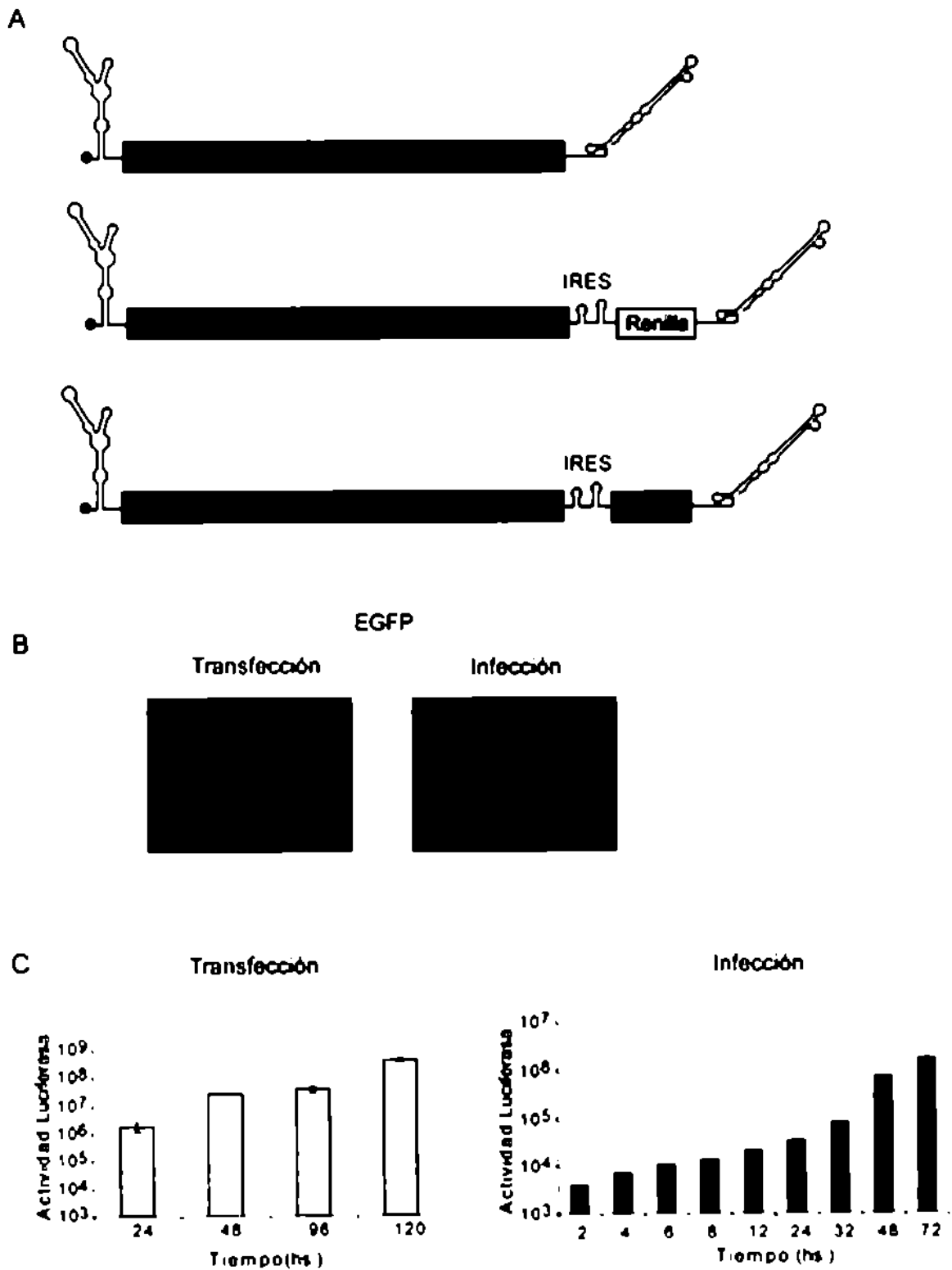


Figura 8. Virus reporteros bistrónicos. **(A)** Esquema del DENV WT y de los virus reporteros llevando el gen de Renilla (DV-R) y el gen de EGFP (DV-GFP) **(B)** Fotografías tomadas con un microscopio de fluorescencia a los 2 días post-transfección y 3 días post-infección con el virus DV-GFP. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 200X. **(C)** Medida de la actividad luciferasa determinada en células transfectadas o infectadas con el virus DV-R. Los tiempos indican horas post-transfección o post-infección

Como inhibidor de la replicación del RNA se utilizó un análogo estructural de la adenosina llamado 2'-C-metiladenosina, el cual ha sido descrito como un potente inhibidor de las polimerasas de HCV y DENV (Eldrup, Allerson et al 2004; Ng, Gu et al 2007). El agregado de la 2'-C-metiladenosina al momento de la infección produjo una disminución de la actividad luego de las 12 hpi (Figura 9A). Esta disminución se hizo más evidente a tiempos más largos, observándose una completa inhibición a las 48 hpi. Estos resultados sugieren que durante las primeras 12 hpi el RNA viral es principalmente traducido, ya que se obtiene una actividad similar tanto para las células tratadas con 2'-C-metiladenosina como para las células control. Luego de las 12 hpi comienzan a sintetizarse proteínas de las nuevas moléculas de RNA sintetizadas, ya que la actividad luciferasa en las células control comienza a aumentar, pero no la de las células tratadas con el inhibidor.

De esta forma, el DV-R es una buena herramienta para estudiar las distintas etapas del ciclo viral usando un ensayo de actividad luciferasa.

El virus DV-R es una herramienta útil para determinar el modo de acción de antivirales

En un trabajo en colaboración con un laboratorio dedicado a la búsqueda de compuestos con actividad antiviral, se empleó el virus reportero para determinar el modo de acción del compuesto SA-17, derivado del antibiótico doxorubicina. Éste fue identificado como un inhibidor de la replicación del DENV en ensayos *in vitro*.

El efecto del SA-17 fue evaluado con el DV-R para determinar qué etapa del ciclo de replicación viral es blanco del compuesto. Distintas concentraciones del SA-17 fueron agregadas a células infectadas con el DV-R al tiempo de la infección, o a distintos tiempos luego de la infección. A las 24 hpi, la actividad luciferasa fue cuantificada (Figura 9B). Cuando la infección se llevó a cabo en presencia del SA-17, se observó una inhibición del 98% con una concentración de 10 µg/ml. Sin embargo, cuando el compuesto fue agregado después de la infección, el SA-17 no inhibió eficientemente la replicación viral. Estos resultados sugieren que el SA-17 interfiere en etapas tempranas de la replicación viral, como la unión o la entrada del virus a la célula.

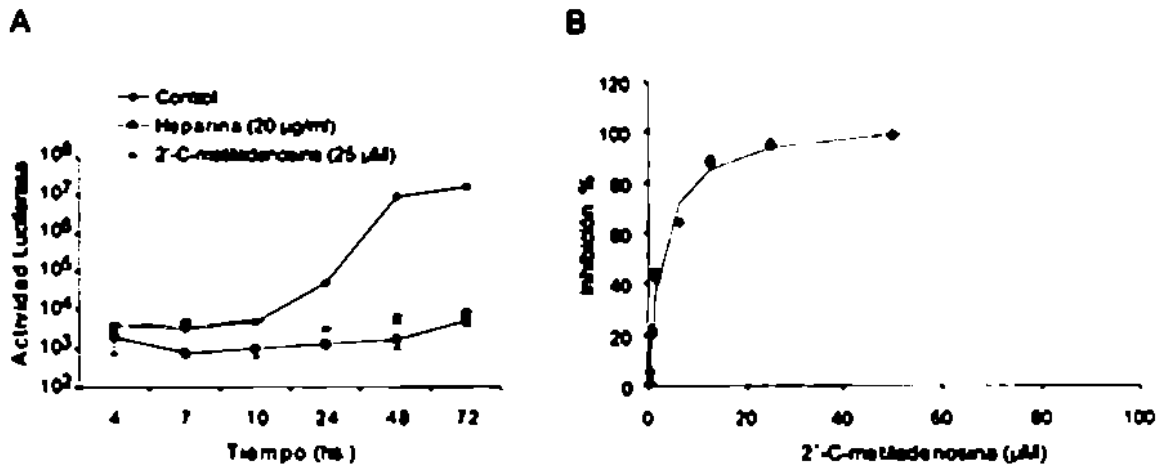


Figura 9. Efecto de compuestos antivirales sobre la replicación del DV-R. (A) Heparina, inhibidor de la entrada viral; 2'-C-metiladenosina, inhibidor de la polimerasa viral. La actividad luciferasa fue medida a los tiempos post-infección indicados (B) Utilización del compuesto SA-17 como antiviral. El SA-17 fue agregado a los tiempos post-infección indicados. La actividad luciferasa se cuantificó a las 24 hpi.

Desarrollo de virus reporteros monocistrónicos

Si bien los virus reporteros bicistrónicos son herramientas poderosas para el estudio de la replicación viral, presentan algunas limitaciones. A pesar de que se obtuvieron altos títulos y crecimientos similares al virus WT, la actividad luciferasa caía dramáticamente luego de un pasaje del stock viral en cultivo, lo que probablemente se deba a la pérdida del gen reportero por parte del virus. Además, dado que el IRES de EMCV sólo funciona en células de mamífero, los virus monocistrónicos no pueden ser usados en células de mosquito. Por último, la traducción del gen de la luciferasa depende del IRES y no del 5' UTR capeado del virus, por lo que la cuantificación de la actividad luciferasa es una medida indirecta de la replicación viral. Por estas razones se decidió desarrollar una nueva generación de virus reporteros, monocistrónicos.

Para ello se introdujeron los genes de la luciferasa río arriba de la secuencia de la proteína de cápside (C). Entre la luciferasa y la secuencia de C, se introdujo la secuencia de la proteasa 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV2A). Esta proteasa tiene actividad autocatalítica, de modo que asegura la liberación de la proteína reportera de la poliproteína viral.

El extremo 5' de la región codificante de la proteína C posee superposición de funciones, ya que además de codificar para la proteína C la secuencia nucleotídica posee estructuras secundarias de RNA que regulan la replicación viral (Markoff 2003). Por esta razón, los primeros 104 nucleótidos de la secuencia de C fueron duplicados e introducidos río arriba del gen de la luciferasa (Figura 10).

De esta manera, se obtuvieron los virus reporteros monocistronicos mDV-R (que expresa la luciferasa de Renilla) y mDV-Ff (que expresa la luciferasa de Firefly), estando la secuencia del gen reportero en el ORF viral.

Si bien el gen de la luciferasa de Firefly es mayor que el de la luciferasa de Renilla, se decidió introducir ambos genes, debido a la facilidad de obtención del sustrato para la primera. Además, los resultados satisfactorios obtenidos con los virus bicistronicos, resultaron estimulantes para evaluar la posibilidad del uso de genes reporteros de mayor tamaño.

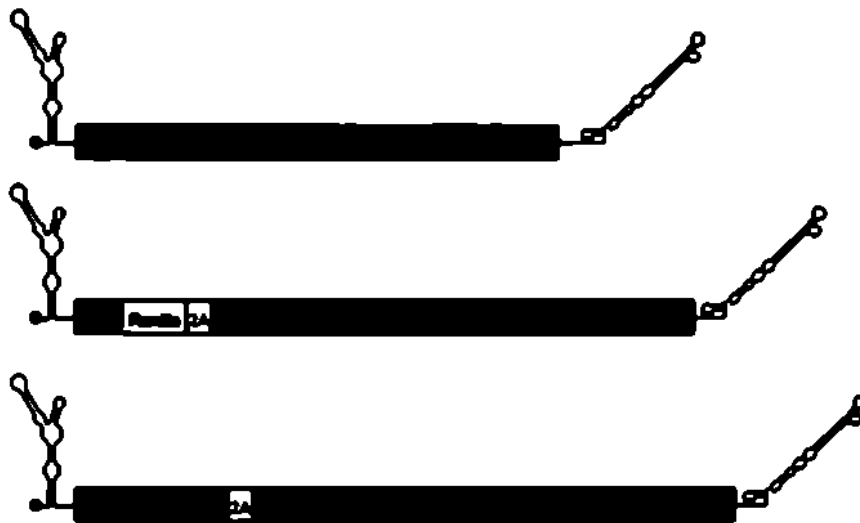


Figura 10. Estructura genómica de los virus reporteros monocistronicos. Se muestra la estructura genómica del DENV WT y de los virus reporteros llevando el gen de Renilla o Firefly. C104, primeros 104 nucleótidos de C; 2A, secuencia de la proteasa 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV2A).

Los virus reporteros monocistronicos replican eficientemente en células de mamífero

Se produjeron RNAs genómicos de las construcciones mDV-R y mDV-Ff, los cuales fueron transfectados en células BHK. Se midió la actividad luciferasa en extractos celulares a distintos tiempos post-infección (Figura 11A). Se observó un aumento de la actividad luciferasa, tanto de Renilla como de Firefly. Se tomaron sobrenadantes de estas células y se utilizaron para infectar células frescas, con el objeto de evaluar la producción de virus infecciosos en los sobrenadantes. Luego de la infección se midió la actividad luciferasa, la cual se incrementó en función del tiempo para las dos construcciones (Figura 11B). Este resultado indica que ambos virus reporteros son capaces de producir virus infecciosos y de propagar.

El tamaño del gen reportero afecta negativamente la encapsidación viral

Con el fin de caracterizar a los virus reporteros mDV-R y mDV-Ff, y evaluar el efecto del tamaño del gen reportero en la encapsidación del genoma viral, se normalizó la actividad luciferasa medida en la transfección y en la infección. Se calculó el cociente $\text{Act.Luc.Infección}/\text{Act.Luc.Transfección}$ entre ambas actividades luciferasa y se pudo obtener un indicador de la eficiencia de encapsidación para ambos virus. Se observó, que tanto a las 24 y 48 hs el cociente era mayor para la construcción mDV-R que para la mDV-Ff. (Figura 11C). Este resultado sugiere, que el virus que lleva el gen reportero de menor tamaño (mDV-R), posee una mayor eficiencia de encapsidación que el virus que lleva el gen reportero de mayor tamaño (mDV-Ff.). Además, los valores absolutos de actividad luciferasa medidos en función de tiempo luego de la transfección y la infección, fueron mayores con la construcción mDV-R. Indicando que la actividad de la luciferasa de Renilla o la eficiencia de traducción de este RNA es mayor a la observada con la construcción mDV-Ff. Debido a esto, para los estudios siguientes se continuó utilizando el virus mDV-R.

El virus reportero mDV-R permite diseccionar las distintas etapas de la replicación viral

Al igual que para el virus bicistrónico DV-R, se utilizaron los compuestos heparina y 2'-C-metiladenosina, con el fin de determinar si el virus mDV-R era una herramienta útil para el estudio de las distintas etapas de la replicación viral.

En células infectadas y sin tratar, se detectó actividad luciferasa desde las 4 hpi, incrementándose en función del tiempo. A partir de las 10 hpi, se observó un gran aumento de actividad, hasta las 72hpi (Figura 12A). El agregado del inhibidor de la entrada viral heparina durante la infección, produjo niveles de luciferasa cercanos al basal. La 2'-C-metiladenosina, inhibidor de la replicación del RNA, no afectó la actividad hasta las 10 hpi, pero a partir de este tiempo se produjo una disminución casi total de esta.

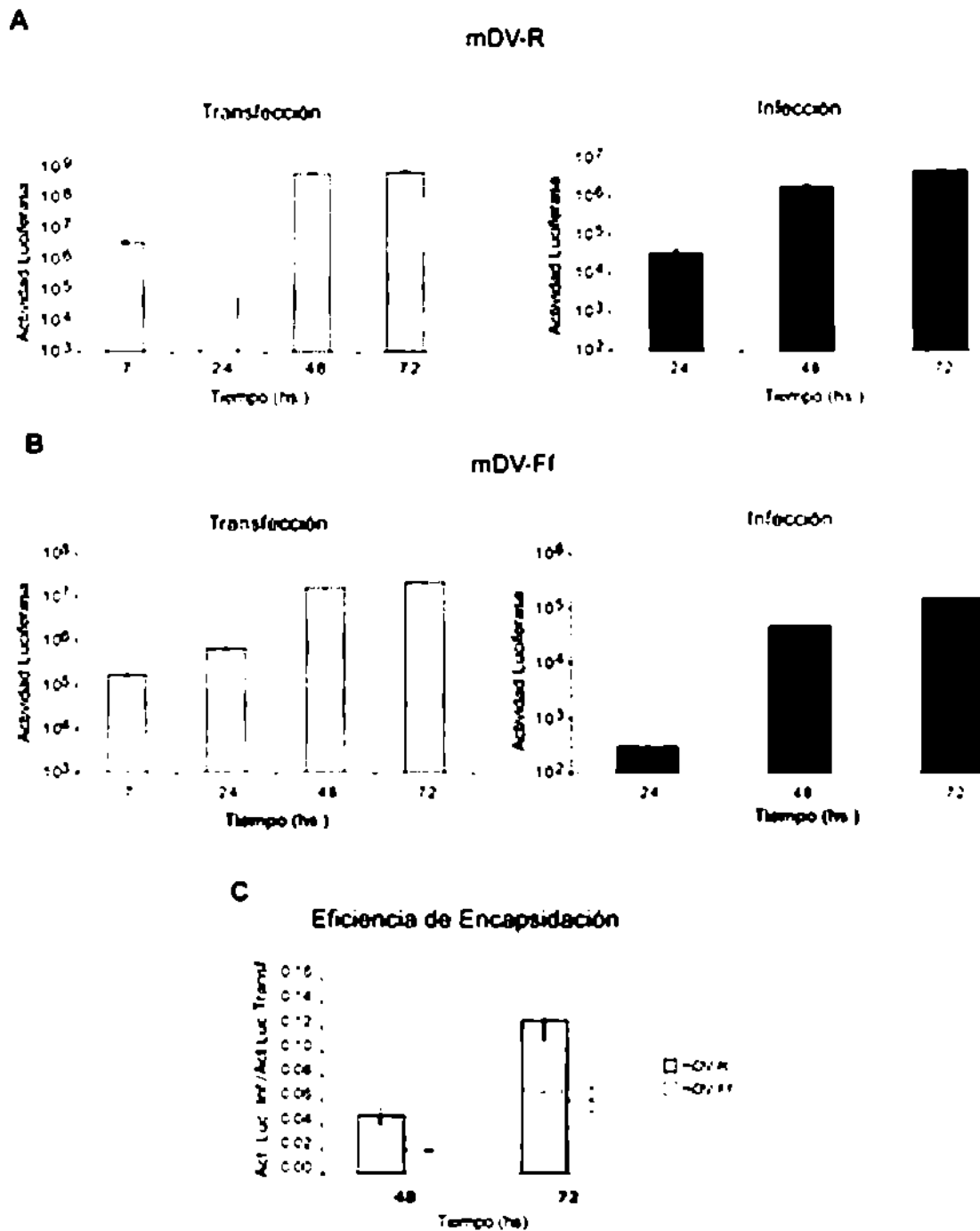


Figura 11. Transfecciones e infecciones en células de mamífero con los virus reporteros monocistronicos. **(A)** Medida de la actividad luciferasa de células BHK transfectadas o infectadas con el virus mDV-R. **(B)** Medida de actividad luciferasa de células BHK transfectadas o infectadas con el virus mDV-F1. **(C)** Comparación de la eficiencia de encapsulación entre los virus mDV-R y mDV-F1. Act Luc Infección/Act Luc Transfección, cociente obtenido al normalizar la actividad luciferasa medida en células transfectadas o infectadas por los virus reporteros en (A) y (B)

Estos resultados en conjunto, indican que hasta las 10 hpi la medida de la actividad reportera refleja la traducción del RNA viral, ya que esta etapa del ciclo viral no es afectada por el 2'-C-metiladenosina. A partir de las 10 hpi la actividad refleja la replicación del RNA

viral, ya que el compuesto posee un efecto dramático sobre la actividad luciferasa a partir de este tiempo.

Se realizó el cálculo de la concentración efectiva 50 % (CE_{50}) de la 2'-C-metiladenosina, midiendo para esto la actividad luciferasa del mDV-R a distintas concentraciones del compuesto (Figura 12B). Se obtuvo un valor de $CE_{50} = 3.0 \mu M$. Previamente, ha sido publicada una $CE_{50} = 3.34 \mu M$ para este compuesto, utilizándose el virus WT en un ensayo de inmunofluorescencia (Ng, Gu et al. 2007). Este resultado indica que el ensayo del virus reportero es comparable al virus WT, para la actividad antiviral del compuesto testeado. Además, sugiere que el virus reportero es una buena herramienta para ser utilizada en la búsqueda de drogas antivirales, ofreciendo la ventaja de una medición rápida y sencilla de la actividad luciferasa.

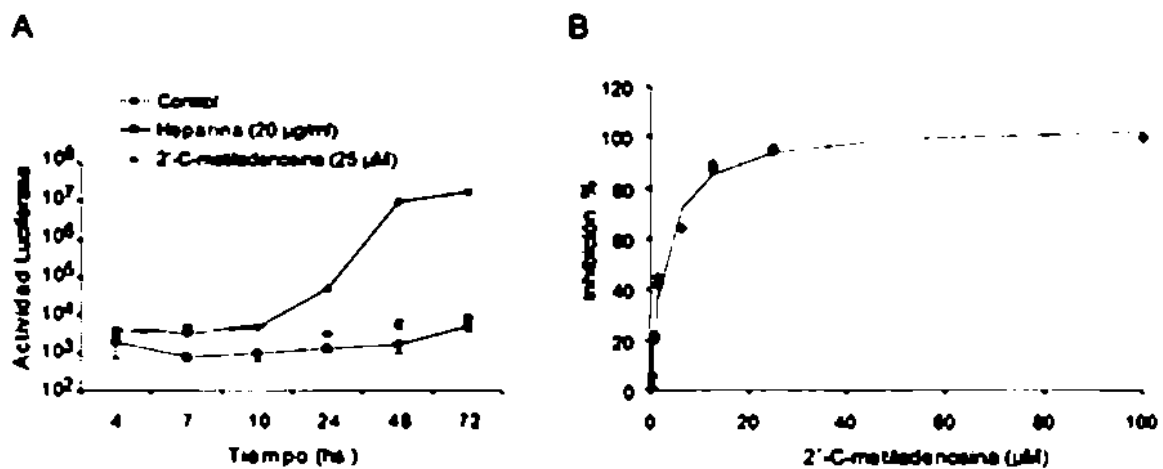


Figura 12. Efecto de compuestos antivirales en la replicación del mDV-R. (A) Utilización del inhibidor de la entrada viral (heparina) y de la polimerasa viral (2'-C-metiladenosina). La actividad luciferasa fue medida a los tiempos post-infección indicados. (B) Curva para cuantificar la concentración efectiva 50 % (CE_{50}) de la 2'-C-metiladenosina. La actividad luciferasa fue medida a las 30 hpi.

El virus reportero mR-DV replica en células blanco de una infección natural

Una de las desventajas del virus reportero bicistrónico DV-R, está dada por la imposibilidad de utilizarlo en células de insecto, ya que el IRES de EMCV no funciona en estas células. Debido a que el mDV-R posee un solo marco de lectura y que la traducción del gen reportero está bajo control traduccional del virus, se decidió testear este virus en células de mosquito.

Con el fin de generar stocks del virus reportero en células de mosquito, se transfirieron células C6/36 con RNAs genómicos del mDV-R. Los sobrenadantes producto de la transfección, fueron utilizados para infectar células C6/36 y medir la actividad luciferasa

en función del tiempo. Se observó un incremento de la actividad, indicando que los virus mDV-R son capaces de replicar y propagar en células de insecto (Figura 13A).

Se ha postulado, que las células dendríticas (DCs) son blanco primario durante una infección natural por DENV en el hombre (Wu, Grouard-Vogel et al. 2000). Por esto, decidimos testear si el mDV-R era capaz de infectar un cultivo primario de DCs humanas. Así, se infectaron DCs con un stock de mDV-R producido en células C6/36 y se evaluó la infectividad a través de la medida de la actividad luciferasa. Como se observa (Figura 13B), se pudo medir actividad a las 24hpi, incrementándose esta a las 48 hpi.

Estos resultados muestran que el mDV-R es capaz de infectar distintos tipos celulares importantes en el ciclo natural de infección del DENV, como son las células de mosquito y las células dendríticas.

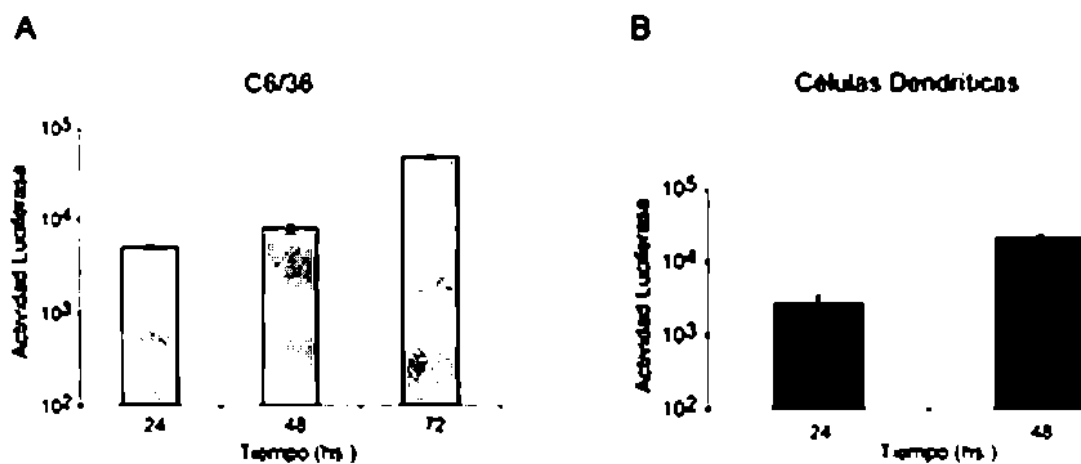


Figura 13. Infección del mDV-R en células de mosquito (A) y células dendríticas (B). La actividad luciferasa fue medida a los tiempos post-infección indicados.

Cinética de replicación del DV-R y el mDV-R

Con el fin de comparar la replicación de ambos virus reporteros, se realizó la transfección en paralelo con iguales cantidades de los RNAs de los virus DV-R y mDV-R. Además, también se transfectaron RNAs de ambos virus con mutaciones esenciales en el sitio catalítico de la polimerasa viral, que han demostrado ser letales para la replicación de los flavivirus (Khromykh, Kenney et al. 1998). Luego de la transfección de los RNAs se midió la actividad de ambas luciferasas en función del tiempo.

El virus monocistrónico en su versión WT (mDV-R WT) mostró un gran aumento de la actividad luciferasa, de 100 veces entre las 5 y las 96 hpi. Por otra parte, la versión

mutante (mDV-R NSS mut.) mostró un decaimiento muy rápido de la actividad, obteniéndose a las 96 hpt niveles de actividad cercanos al blanco (Figura 14A).

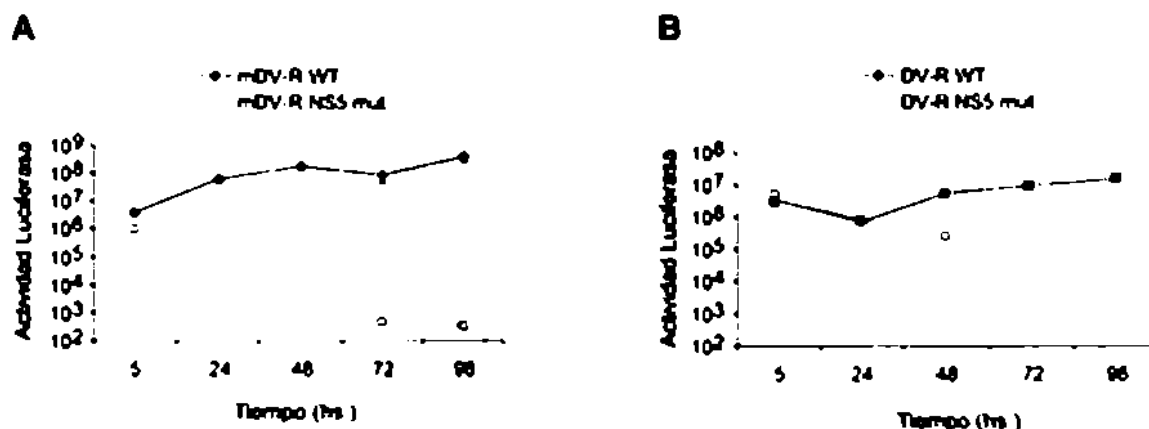


Figura 14. Comparación de la cinética de replicación de los virus reporteros. (A) Transfección de células BHK con RNAs genómicos de los virus mDV-R WT y mDV-R NSS. (B) Transfección de células BHK con RNAs genómicos de los virus DV-R WT y DV-R NSS. La actividad luciferasa fue medida a los tiempos post-transfección indicados.

La transfección de los RNAs bicistrónicos mostró niveles de actividad similares a los medidos para los RNAs monocistrónicos a las 5 hpt. Sin embargo, la actividad de la versión WT (DV-R WT) mostró una disminución a las 24 hpt, pero finalmente aumentó luego de ese tiempo, reflejando la replicación del RNA viral (Figura 14B). Se midió un aumento de solo 15 veces entre la actividad medida a las 5 y 96 hpt. La versión mutante del virus (DV-R NSS mut.) mostró una disminución de la actividad, indicando el efecto aberrante de la mutación sobre la replicación. A pesar de esto, se observó una cinética de decaimiento muy lenta, obteniéndose valores de actividad muy altos, inclusive a las 96 hpt.

Estos resultados sugieren que la presencia del IRES de EMCV y el gen reportero en el virus DV-R, debe tener un efecto negativo sobre la replicación viral, ya que la replicación del RNA recién comienza a detectarse luego de las 24 hpt. Además, el hecho que el virus DV-R NSS mut. presente una cinética de decaimiento muy lenta, con altos valores de actividad inclusive a tiempo largos, refleja que el IRES es un inductor potente de la traducción viral, inclusive sobre RNAs no replicativos y quizás parcialmente degradados.

El virus mDV-R permite realizar estudios de trans-complementación genética

Recientemente se describió la producción de partículas reporteras pseudo-infectivas de dengue por complementación (Ansarah-Sobrinho, Nelson et al. 2008). Para esto, células

que expresaban un replicón subgenómico (en el cuál las proteínas estructurales se reemplazaron por el gen de la EGFP) fueron transfectadas con un plásmido que expresaba las proteínas estructurales. De esta manera, los genomas de los replicones fueron trans-complementados por los genes que expresaban las proteínas estructurales, formando RVPs (*reporter virus particles*). Estos virus, son capaces de generar una sola ronda de infección, conservando el genoma del gen reportero.

El mDV-R, fue utilizado para evaluar su utilidad en ensayos de trans-complementación. Para esto se usó una versión del virus a la cual se le eliminó la proteína C (mDV-R Δ C). El RNA de este virus se tradujo y replicó sin inconvenientes (Figura 15A). Sin embargo, como era de esperar, no se produjeron partículas de este mutante, ya que no se detectó actividad luciferasa al infectar células frescas con los sobrenadantes de transfección (Figura 15B). También se utilizó el mDV-R.NSSmut. El RNA de este virus fue traducido pero no pudo replicar, por lo tanto no se detectaron virus en el sobrenadante.

Se realizó la trans-complementación co-transfectando los RNAs de los mDV-R Δ C con RNA del DENV WT. Se observó que la proteína C suministrada en *trans* fue capaz de encapsidar a los virus mDV-R Δ C. Sin embargo, la proteína NSS WT suministrada en *trans*, no permitió la replicación y encapsidación del mDV-R.NSSmut.

Así, este nuevo virus reportero, permitió realizar estudios de *trans*-complementación. Tiene la ventaja respecto a las RVPs, que permite evaluar individualmente el efecto de las proteínas estructurales en *trans*, en el contexto del virus, y no mediante el uso de plásmidos.

Desarrollo de un virus reportero monocistrónico que expresa GFP

Ya que el virus mDV-R (monocistrónico) demostró ser una herramienta genética más poderosa que el virus DV-R (bicistrónico), se decidió desarrollar un virus reportero monocistrónico con EGFP. Se llamó a este virus mDV-GFP (Figura 16A).

RNAs del mDV-GFP fueron transfectados en células BHK, y se observaron células EGFP positivas a partir de las 48 hpt (Figura 16B).

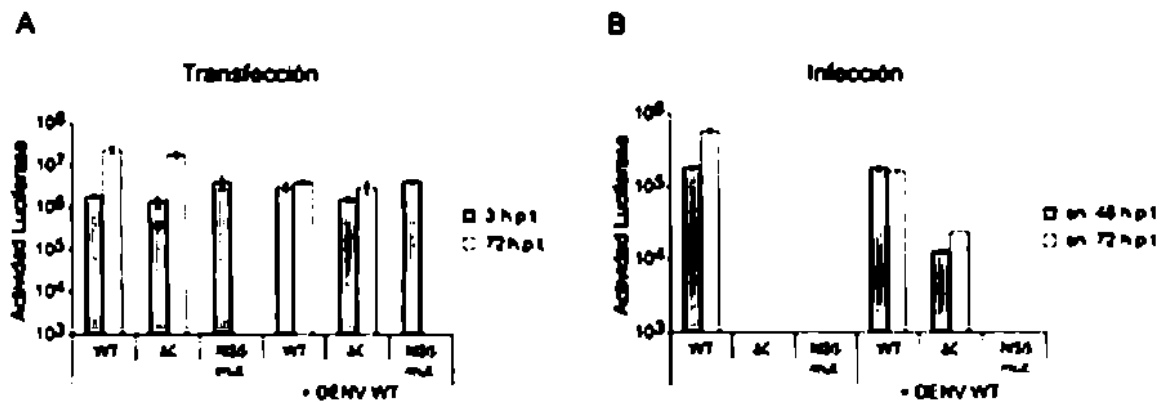


Figura 15. Ensayo de trans-complementación genética. (A) Transfección de RNAs genómicos de los virus mDV-R WT, mDV-R-ΔC y mDV-R-NSSmut, en presencia o ausencia de RNAs genómicos del virus DENV WT. La actividad luciferasa se midió a las 3 y 72 hs. post-transfección. (B) Infección con los sobrenadantes obtenidos luego de 48 y 72 hs. post-infección en (A). La actividad luciferasa se midió a las 48 hs post-infección.

Con el fin de evaluar la producción de virus reporteros infectivos, células frescas fueron infectadas con sobrenadantes de células transfectadas. Se detectaron células positivas para GFP desde las 48hpi, evidenciando que el mDV-GFP es capaz de producir virus infecciosos, encapsidando el gen reportero.

Con el fin de aumentar el título de los mDV-GFP producidos se testearon distintas líneas celulares, determinándose que las células C6/36 daban mejores títulos del virus reportero. De esta manera se logró aumentar la carga viral, obteniéndose casi la totalidad de las células con marca para GFP a las 48 hpi. Además, estos stocks virales fueron testeados mediante análisis por FACS de células infectadas, detectándose la marca de GFP en más del 90 % del total de las células infectadas (Figura 16C).

El virus mDV-GFP es una herramienta útil para la realización de ensayos en formato de gran escala

El virus mDV-GFP presenta la ventaja respecto de los virus reporteros con luciferasas, de que no se requiere ni la lisis celular ni el uso de sustratos para la medida de la fluorescencia de GFP. Por este motivo se decidió testear al virus en un formato de gran escala, midiendo la cantidad de fluorescencia emitida por la GFP, utilizando para esto un fluorímetro.

Células BHK fueron infectadas con virus mDV-GFP producidos en células C6/36 en un formato de 96 pocillos. Se observó fluorescencia mayor al blanco a partir de las 16 hpi, incrementándose esta en función del tiempo (Figura 17A). Además, el uso del inhibidor de

la polimerasa NS5 2'-C-metiladenosina, produjo una inhibición de la replicación viral dependiente de la dosis a las 48 hpi (Figura 17B).

Estos resultados confirman, que el virus mDV-GFP, podría ser una herramienta útil para la búsqueda de drogas antivirales en un formato de gran escala.

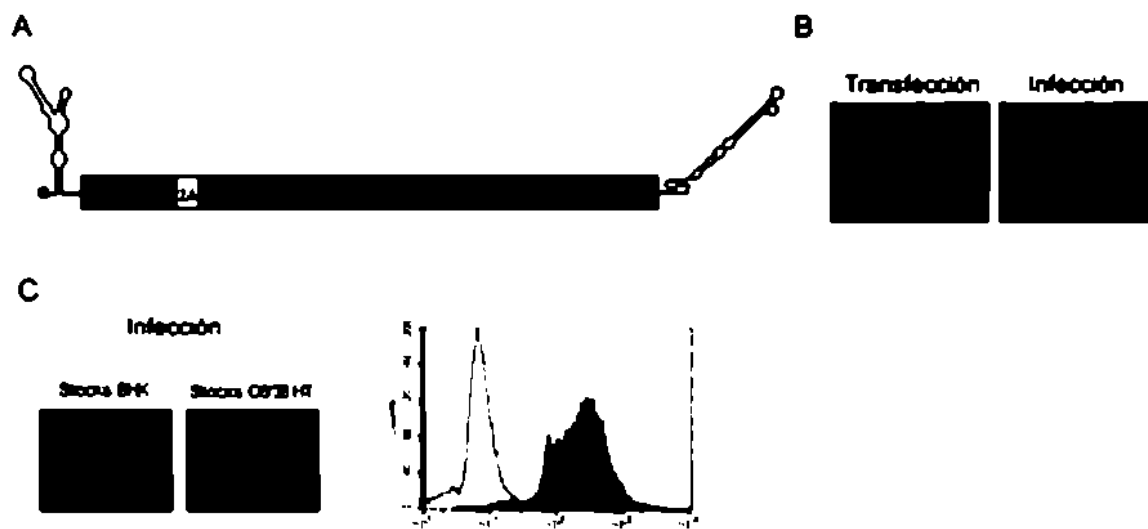


Figura 16. Virus monocistrónico mDV-GFP. (A) Esquema del virus mDV-GFP. (B) Fotografía tomada con un microscopio de fluorescencia a células transfectadas e infectadas por el virus mDV-GFP. Las imágenes fueron tomadas a las 48 hs post-transfección o infección. (C) Fotografía de células BHK infectadas con stocks virales producidos en células C6/36, a las 48 hpi. Análisis por FACS de las células infectadas por el virus mDV-GFP (color verde).

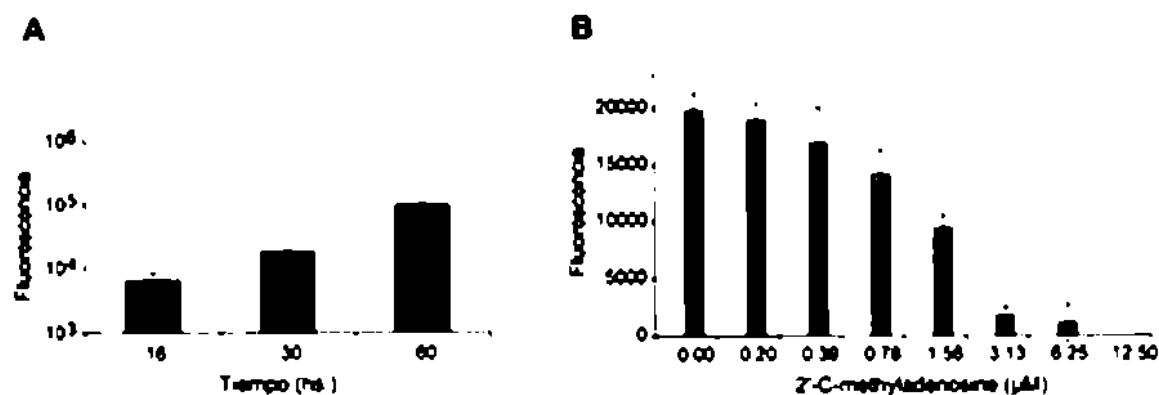


Figura 17. Análisis de fluorimetría de células infectadas con el virus mDV-GFP. (A) Cuantificación de la fluorescencia de células infectadas con el virus mDV-GFP a distintos tiempos post-infección. (B) Cuantificación de la fluorescencia de células infectadas con el virus mDV-GFP en presencia del compuesto 2'-C-metiladenosina. La medida de la actividad luciferasa se realizó a las 48 hs post-infección. La fluorescencia está expresada en unidades arbitrarias.

2) Secuenciación y construcción del primer clon infeccioso de dengue argentino

Debido a que no existe ningún clon infeccioso de DENV de un aislamiento argentino, y a la importancia que tienen estas herramientas para conocer aspectos básicos de la biología del virus, para la búsqueda de antivirales y el desarrollo de vacunas, se planteó como objetivo desarrollar un clon infeccioso. Para esto, fue cedido gentilmente por el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" (INEVH), el aislamiento clínico de DENV2 67655, obtenido de un paciente con fiebre por dengue en la Provincia de Salta en el año 2006. El virus, fue aislado en células de mosquito C6/36, a partir de suero del paciente.

Secuenciación completa del genoma de DENV de un aislamiento de Salta

Ya que el aislamiento conseguido no estaba secuenciado, primeramente se secuenció el genoma. Un stock del aislamiento de DENV2 se empleó para el aislamiento del RNA viral. A partir del RNA viral se realizó la transcripción reversa, empleando cebadores con secuencias al azar para así obtener el cDNA. La amplificación del cDNA se realizó por PCR, empleando para esto cebadores específicos que hibridaban en regiones conservadas del DENV2. Ya que no ha sido publicada ninguna secuencia completa de un aislamiento de DENV2 argentino, se tuvieron que diseñar cebadores que hibridaran con regiones conservadas de DENV2. Para determinar cuáles eran las regiones conservadas de DENV2, se obtuvieron secuencias de genomas completos de DENV2 de bases de datos públicas y se realizó un alineamiento de las mismas.

Se realizaron 40 amplificaciones por PCR, cubriendo en ambos sentidos el genoma completo. Estas PCRs se secuenciaron directamente en ambas direcciones. A partir de las secuencias obtenidas se ensambló el genoma completo, utilizándose para esto el programa *Genius* (Biomatters Ltd).

Análisis filogenético del aislamiento DENV de Salta

Debido al valor de poseer la secuencia completa de un aislamiento clínico de DENV2 local, se decidió estudiar la filogenia del mismo. Para esto se utilizó una versión mejorada del método de distancia *Neighbor Joining* (Gascuel 1997). Se realizó el análisis filogenético de la secuencia completa del aislamiento Salta. Se utilizaron las cepas de referencia del *Viral Bioinformatics Resource Center* (VBRC), las cuales consisten en 34 secuencias que cubren

18 genotipos diferentes. Del análisis se obtuvo que el aislamiento en cuestión pertenece al genotipo Asiático-Americano 2 (Figura 18).

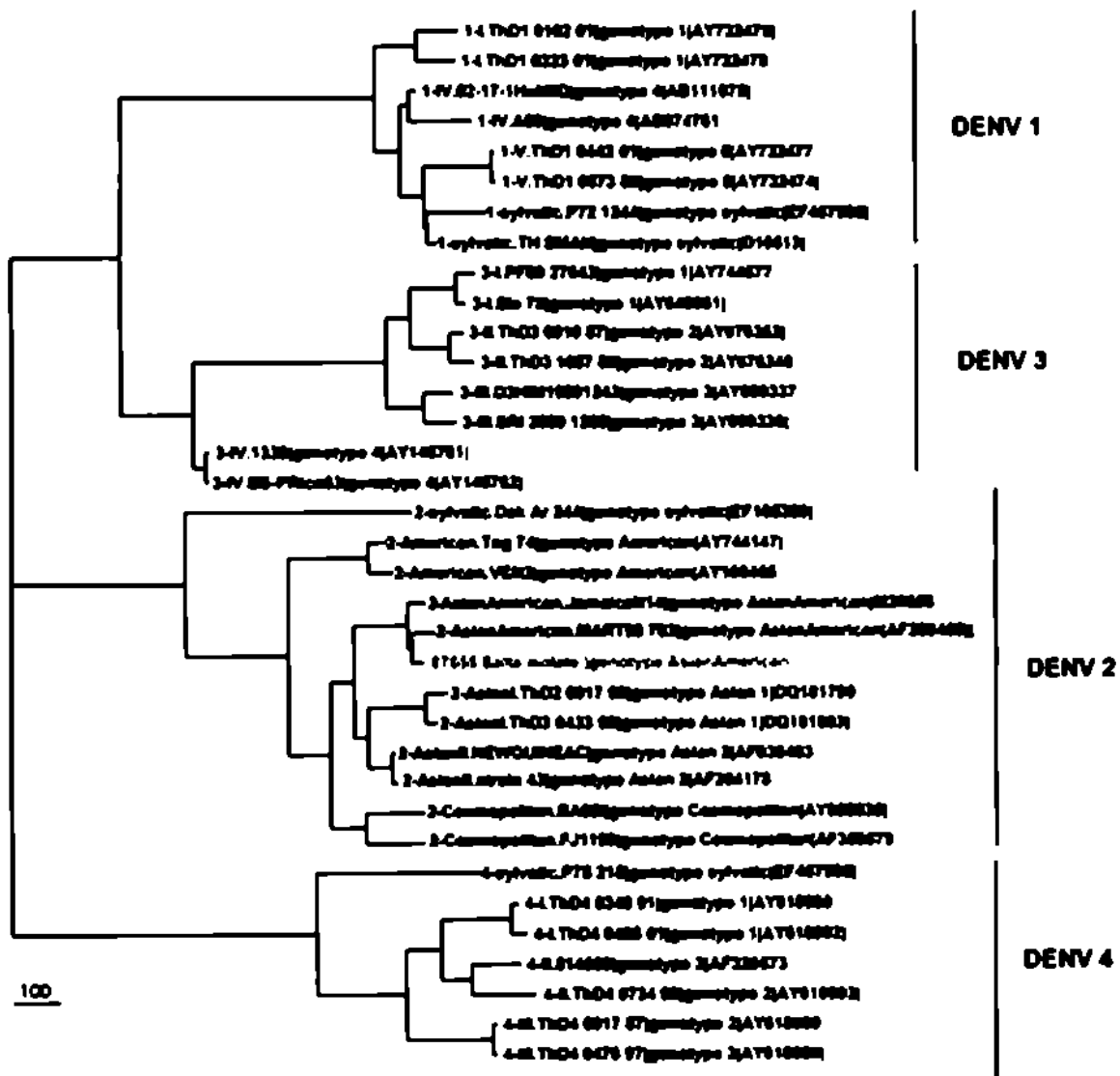


Figura 18. Análisis filogenético y genotipificación del aislamiento DENV2 67655.

Desarrollo de un clon infeccioso de dengue local

Una vez obtenida la secuencia completa del aislamiento de DENV2 67655, se diseñó una estrategia para el clonado del cDNA con el fin de obtener un clon infeccioso.

Como se mencionó anteriormente, la construcción de clones infecciosos que puedan propagarse en bacterias, muchas veces es dificultosa; aparentemente porque las secuencias de DENV o productos de su traducción resultan tóxicos para las bacterias. Además, en experiencias propias en nuestro laboratorio, muchas veces se presentó la

dificultad de crecer bacterias recombinantes con regiones codificantes para las proteínas estructurales del DENV. Teniendo en cuenta esto, se elaboró una estrategia de clonado en dos sistemas diferentes. Por un lado, se utilizó el plásmido de bajo número de copias pR322, y por otro lado, un cromosoma artificial bacteriano (pBeloBac) que se mantiene en solo una o dos copias por bacteria (Shizuya, Birren et al. 1992).

Puesto que el genoma del virus tiene cerca de 11000 bases, se diseñó una estrategia de clonado en fragmentos de menor tamaño. Para esto fue necesario contar con sitios únicos de restricción en el genoma del virus. Se decidió dividir el genoma en siete fragmentos, con el fin de clonar consecutivamente cada uno de ellos en el vector final. Se realizaron siete RT-PCRs con cebadores específicos, los productos fueron clonados en el vector pGEM-T y secuenciados en ambos sentidos, con el fin de lograr una secuencia igual a la obtenida luego de secuenciar el aislamiento. De esta forma se evitó introducir mutaciones en el clonado final.

Debido a que los sitios únicos de restricción del DENV2, en contexto del pR322 y el pBeloBac, eran sólo tres (*Eag* I, *Bst*B I, y *Nhe* I), se adicionaron los sitios de restricción *Sph* I, *Sac* I y *Pme* I mediante oligonucleótidos a través de PCRs. Es importante destacar que estos nuevos sitios de restricción se diseñaron sin cambiar la secuencia de aminoácidos del aislamiento (Figura 19).

A través de la RT-PCR1, se introdujeron: la secuencia del promotor de T7 río arriba del 5'UTR del virus, y el sitio de restricción para *Mlu* I. El promotor de T7 se clonó para realizar la transcripción *in vitro* del cDNA del virus a RNA; y el sitio *Mlu* I, para permitir el clonado de la RT-PCR entre los sitios *Mlu* I/*Sph* I. En la RT-PCR 7, se incluyó el sitio *Xho* I, y el sitio *Asc* I. El primero se incluyó para linealizar el plásmido antes de realizar la transcripción *in vitro*, y el segundo para permitir el clonado de este fragmento.

Para clonar las siete RT-PCRs, se introdujo tanto en el plásmido pR322 como en el pBeloBac, un sitio múltiple de clonado (MCS) con los sitios de restricción desde *Mlu* I hasta *Asc* I.

En el plásmido pR322 se pudo clonar sucesivamente desde la RT-PCR 1 hasta la RT-PCR 5. A medida que se avanzaba en los clonados se observó que las colonias de las bacterias eran más pequeñas, y que los cultivos líquidos crecían menos. Debido a esta dificultad, tanto las placas de bacterias como los cultivos líquidos se cultivaron a baja temperatura (hasta 18 °C) y con baja concentración de antibiótico. Sin embargo, no fue posible seguir avanzado con esta estrategia, ya que nunca se recuperaron colonias de bacterias con la construcción pR322.RT.PCR1-6.



Figura 19. Estrategia para la construcción del Clon Salta. (A) Estructura genómica del aislamiento. Se indican los sitios únicos de restricción, al igual que las RT-PCRs realizadas. (B) Estructura del Clon Salta luego del ensamblado. Los sitios únicos de restricción agregados se encuentran indicados en color rojo. (C) Detalle de secuencias. En color rojo se indica la secuencia del Promotor de T7. La flecha negra indica el comienzo ORF viral.

Afortunadamente, fue posible clonar las siete RT-PCRs en el pBeloBac.MCS. Por precaución, para evitar re-arreglos del DNA, las placas de bacterias y los cultivos líquidos fueron crecidos a 28 °C, y con una baja concentración de antibiótico. De esta forma, se logró clonar exitosamente el cDNA completo del aislamiento de DENV2 67655 de Salta. Se llamó a la construcción final pBeloBac.DENV2.Salta (Clon Salta).

El Clon Salta produjo partículas virales infectivas eficientemente

Con el fin de realizar la transcripción *in vitro* del nuevo clon infeccioso, se purificó a partir de cultivos de bacterias, el bácido pBeloBac.DENV2.Salta. Luego se lo linealizó con la enzima *Xho* I, con el fin de obtener un molde para la transcripción *in-vitro* (Figura 20).

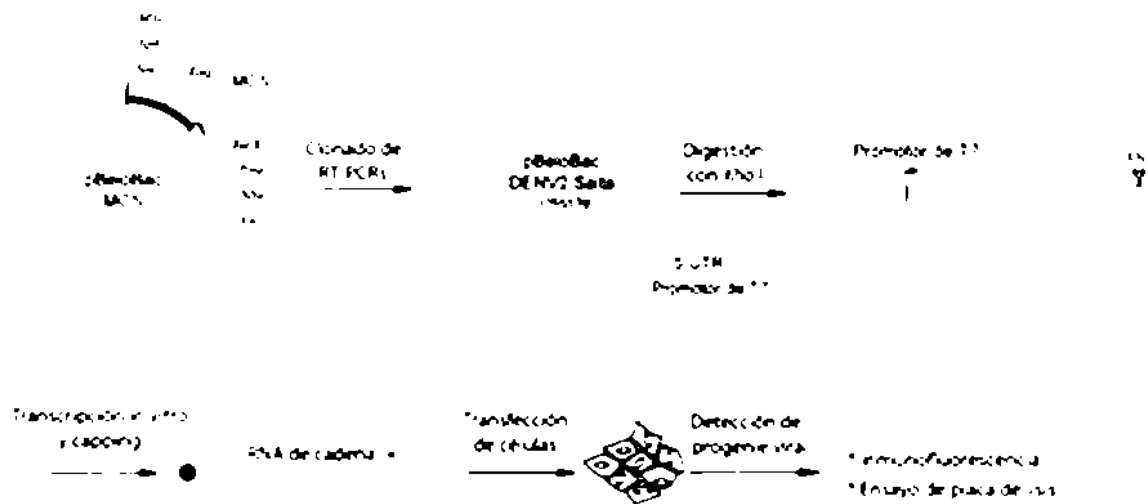


Figura 20. Sistema de genética inversa utilizado para producir partículas infecciosas del Clon Salta.

Debido a que el DENV posee en el extremo 5'UTR una estructura tipo cap, se incluyó en la mezcla de transcripción el análogo de cap m⁷GpppA. Esta molécula es incorporada por la enzima T7 en el extremo 5' del transcripto.

El producto de transcripción fue resuelto en un gel de agarosa libre de RNAsas (Figura 21A). Se obtuvo una banda discreta de RNA genómico, con un peso similar al RNA del Clon DENV 16681, utilizado como control.

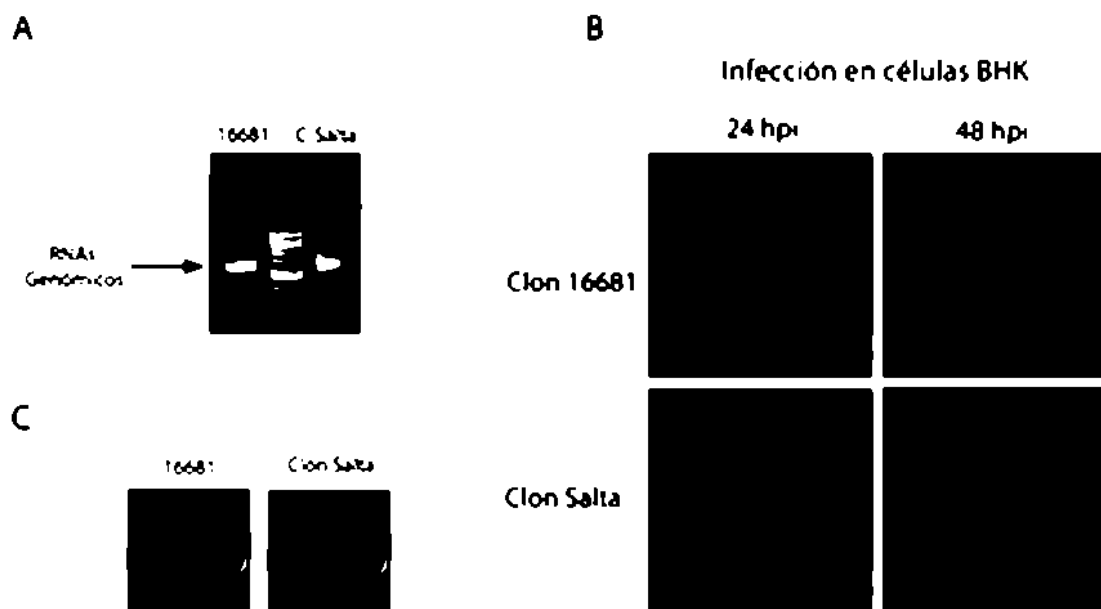


Figura 21. Producción de virus a partir del Clon Salta. (A) Gel de agarosa mostrando los RNAs genómicos completos del virus 16681 y Clon Salta luego de la transcripción *in vitro*. (B) Ensayos de IF de células BHK infectadas con los virus 16681 y Clon Salta a las 24 y 48 hpi. (C) Placas de virus formadas por los virus 16681 y Clon Salta.

Con el fin de evaluar si los RNAs del DENV2.Salta eran infectivos y capaces de iniciar un ciclo de replicación viral, fueron purificados y transfectados en células BHK y C6/36.

Se realizaron ensayos de IF sobre células BHK, a las 24 y 48 hpt con un anticuerpo específico dirigido a la proteína de envoltura. Se detectaron antígenos positivos a las 24 y 48 hpt, aumentando estos en función del tiempo, sugiriendo la existencia de propagación viral (Figura 21B).

Los sobrenadantes obtenidos luego de la transfección fueron utilizados para determinar la presencia de virus infectivos. Para esto se realizó un ensayo de placa de lisis. La presencia de placas de lisis, reveló la existencia de virus en el sobrenadante de las células transfectadas. Además, se observó un tamaño de placa de lisis más grande para los virus del DENV2.Salta, respecto a las obtenidas para el virus 16681 (Figura 21C). Esto último, puede indicar un mayor crecimiento del Clon Salta o un mayor efecto citopático sobre las células.

Debido a que durante el clonado del cDNA se podrían haber introducido mutaciones, se realizaron curvas de crecimiento para comparar el crecimiento del Clon Salta y del aislamiento clínico o parental que le dio origen, 67655. Además, se comparó con el crecimiento de otros clones infecciosos de DENV2 disponibles en el laboratorio: el clon infeccioso 16681 del genotipo Asiático I (Kinney, Butrapet et al. 1997) y el clon infeccioso de la cepa NGC (New Guinea C) (Gualano, Pryor et al. 1998). Las curvas de crecimiento se realizaron en células C6/36 y BHK, infectadas con un stock viral obtenido en C6/36, con una MOI de 0.01. Se observó un crecimiento similar del Clon Salta y del aislamiento 67655 que le dio origen, tanto en células C6/36 como BHK (Figura 22).

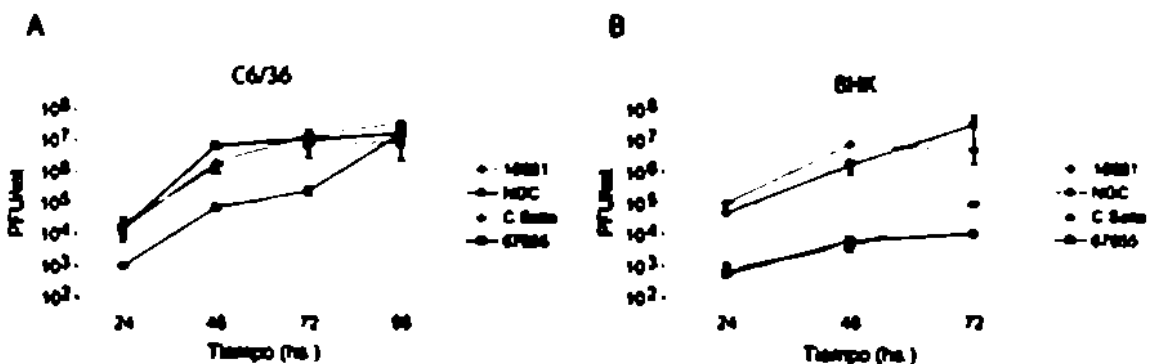


Figura 22. Replicación de distintos aislamientos de DENV2. (A) Curva de crecimiento realizada en células C6/36 con una MOI de 0.01. (B) Curva de crecimiento realizada en células de BHK con una MOI de 0.01.

En células C6/36 el crecimiento del Clon Salta fue similar al observado para el Clon 16681, aunque el del Clon NGC fue sensiblemente menor. Se obtuvieron 100 veces menos virus para el Clon NGC a las 48 hpi.

En células BHK se observó un crecimiento mucho menor tanto del Clon Salta como del aislamiento 67655, respecto de los virus NGC y 16681 (más de dos log a las 48 hpi). Este resultado fue inesperado, debido a que el tamaño de placa de lisis observado para los virus originados del Clon Salta, fue mucho mayor que el de las placas originadas con los virus 16681 (Figura 21C). Es interesante resaltar el comportamiento diferencial del virus 67655 y del Clon Salta en células de mosquito y de mamífero.

El Clon Salta posee una cinética lenta de replicación del RNA

Con el fin de determinar las diferencias de crecimiento en células BHK, entre los clones infecciosos 16681 y Salta, se clonó la luciferasa de Renilla en el Clon Salta. Se utilizó la misma estrategia que se empleó para obtener el virus monocistrónico derivado del Clon 16681, mDV-R (Figura 10). De esta forma se obtuvo un nuevo virus reportero monocistrónico derivado del Clon Salta, al que se llamó mDV-R.Salta.

Se sintetizaron los RNAs genómicos de los virus mDV-R y mDV-R.Salta, e iguales cantidades de RNA se transfectaron en células BHK. Al medir la actividad luciferasa en función del tiempo, se midieron similares valores a las 6 hpt (Figura 23A). Este resultado indica que ambos virus reporteros presentan una misma eficiencia de traducción. Sin embargo, la medida realizada a las 24 hpt, la cual refleja la síntesis del RNA viral, mostró un aumento en la actividad luciferasa para el virus mDV-R, y una caída para el virus mDV-R.Salta. A las 48 hpt, se observó un aumento de la actividad luciferasa de ambos virus, siendo mayor para el mDV-R. Finalmente, a las 72 hpt, los niveles de actividad de ambos virus fueron similares (Figura 23A). Estos resultados muestran que la cinética de replicación del RNA en el Clon Salta es más lenta que para el Clon 16681.

Los sobrenadantes de las células transfectadas se tomaron a las 48 y 72 hpt y se utilizaron para infectar células frescas. Se detectó actividad luciferasa en el extracto de células infectadas con los virus mDV-R.Salta. Este resultado indica que este nuevo virus reportero produce partículas virales infectivas. En concordancia con el retraso observado en la replicación del RNA, se observó una menor actividad luciferasa en el extracto de células infectadas con el virus mDV-R.Salta respecto al mDV-R (Figura 23B).

Otros estudios serán necesarios para determinar porque el Clon Salta posee un mayor efecto citopático (demostrado por un mayor tamaño de placa de lisis) pero un retraso en

la replicación del RNA en células BHK. Una posibilidad podría ser que el Clon Salta y el aislamiento 67655 produzcan virus muy citopáticos en células BHK, razón por la cual se explicaría el bajo número de partículas infectivas producidas en este tipo celular.

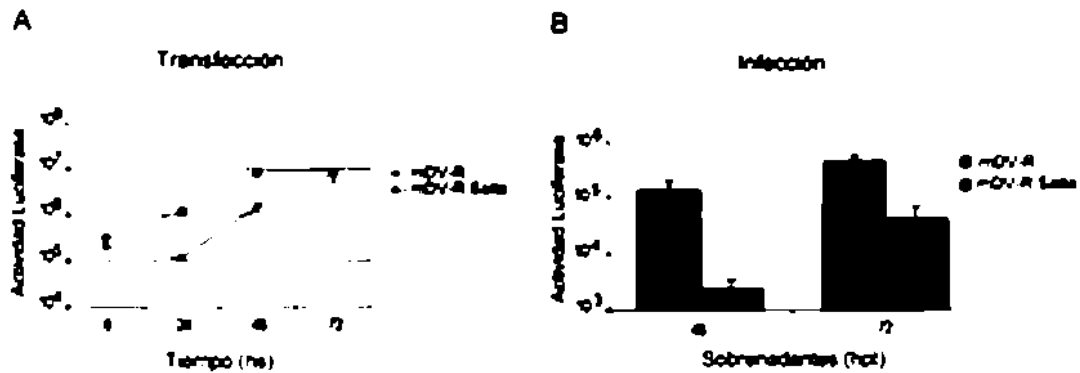


Figura 23. Cinética de replicación del virus mDV-R.Salta. (A) Transfección de células BHK con los RNAs genómicos de los virus mDV-R y mDV-R.Salta. La actividad luciferasa se midió a los tiempos post-transfección indicados. (B) Infección con los virus reporteros mDV-R y mDV-R.Salta. Los sobrenadantes de 48 y 72 hpt se usaron para infectar células BHK. La actividad luciferasa se determinó a las 48 hpi

Discusión

En este capítulo se presentó el desarrollo de nuevas herramientas genéticas para el estudio del DENV.

A lo largo de este capítulo se desarrollaron distintos virus reporteros con el fin de estudiar la replicación del virus a través de un ensayo de fácil lectura, que permitiese utilizarlo para la búsqueda y caracterización de antivirales y para realizar un screen de RNA de interferencia.

Primeramente se presentó una generación de virus reporteros bicistrónicos. Para esto se clonaron los genes reporteros de la luciferasa de Renilla o GFP, río arriba del 3'UTR viral, y bajo el control traduccional del IRES de EMCV. Esta estrategia había sido exitosamente utilizada para generar virus reporteros de JEV y WNV (Yun, Kim et al. 2003; Deas, Binduga-Gajewska et al. 2005; Pierson, Diamond et al. 2005; Pulg-Basagoiti, Deas et al. 2005). De esta manera se obtuvo el primer virus reportero de dengue, el cual produjo partículas infectivas que conservaban el gen foráneo (Figura 8). Este virus reportero permitió diseccionar las distintas etapas de la replicación viral y determinar el modo de acción del SA-17, un compuesto recientemente reportado como un inhibidor de la replicación del virus (Figura 9). Además, con esta nueva herramienta se caracterizaron los mutantes de N-glicosilación de la proteína de envoltura del virus (Capítulo 2 de esta tesis). Sin embargo, los virus reporteros bicistrónicos tuvieron el problema de presentar una alta inestabilidad genómica, ya que la actividad del gen reportero se perdió rápidamente en sólo un pasaje del virus. Además, dado que el IRES de EMCV no funciona en células de insecto, no fue posible utilizar este virus en células de mosquito.

Así, surgió la idea de desarrollar un virus reportero que funcionase tanto en células de mosquito como de mamífero. En un primer intento se colocó el IRES del virus *Rhopalosiphum padi* (RhPV) en lugar del IRES de EMCV. Ha sido descrito que el IRES de RhPV funciona tanto en células de mamífero como de insecto (Woolaway, Lazaridis et al. 2001), razón por la que se pensó que era un buen candidato. Sin embargo, este virus reportero dio muy baja actividad, razón por la cual se decidió cambiar de estrategia (resultado no mostrado).

Como nueva opción surgió la posibilidad de desarrollar un virus reportero monocistrónico, incluyendo al ORF reportero fusionado al ORF viral. El desafío de esta estrategia fue evitar colocar el gen reportero en regiones claves para la replicación del virus. Como primera opción, se clonó el gen de la luciferasa de Renilla río abajo del gen de

N55, el cual codifica para la polimerasa viral. Para evitar afectar la actividad polimerasa, se clonó entre el gen de N55 y el gen reportero, el gen de la proteasa de FMDV, la cual tiene actividad auto catalítica. Estos virus produjeron bajos niveles de actividad luciferasa comparadas con el virus DV-R, por lo que se abandonó esta estrategia (resultado no mostrado).

Finalmente, se clonó la luciferasa de Renilla río arriba de la proteína de cápside, utilizándose también la proteasa de FMDV para permitir la liberación de la proteína reportera una vez sintetizada. Mediante esta estrategia se generaron los virus reporteros mDV-R y mDV-Ff, expresando las luciferasas de Renilla y Firefly respectivamente (Figura 10). Esta nueva generación de virus replicó tanto en células de mamífero como de mosquito (Figura 11). Además, se observó una mayor tasa de replicación respecto a los virus bicistrónicos (Figura 14).

El virus mDV-R demostró ser una herramienta muy útil para el estudio de la biología molecular del virus. En el contexto de esta tesis se lo utilizó para determinar el mecanismo de acción de la droga Brefeldina A, la cual inhibe la replicación de dengue. También, fue utilizado para la realización de un *screen* de RNA de interferencia en un formato de gran escala (Capítulo 3 de esta tesis). Además, dada la buena sensibilidad del mR-DV, se establecieron colaboraciones con otros laboratorios para la transferencia de esta herramienta, con el fin de realizar la búsqueda de inhibidores de la replicación de virus utilizando bibliotecas de compuestos.

Debido a su gran utilidad, el virus reportero es intensamente utilizado en nuestro laboratorio. A través de su uso se describieron los determinantes de encapsidación en la proteína de cápside y se describió el mecanismo de acción de C-75, un nuevo inhibidor de la replicación de DENV (Samsa, Mondotte et al. 2009). Además, el uso del virus reportero permitió determinar la importancia de la dinámica del RNA genómico del virus para su replicación (Villordo, Alvarez et al. 2010).

Siguiendo la estrategia utilizada para desarrollar el mDV-R, se clonó el gen de la GFP, para así obtener el virus monocistrónico mDV-GFP. A través del empleo de este virus, se miniaturizó un ensayo en un formato de 96 pocillos, el cual nos permitió monitorear la replicación viral en función del tiempo a través de la lectura de la fluorescencia (Figura 17). Este virus tiene un gran potencial, ya que no es necesaria la utilización de sustratos para medir una actividad enzimática. Además, es posible medir la fluorescencia de un mismo pocillo en función del tiempo, ya que la lectura no afecta a las células. Actualmente,

este virus es utilizado en colaboración con otros laboratorios para medir por FACS la infectividad viral en cultivos celulares primarios.

A partir de un aislamiento de dengue local se logró obtener el primer clon infeccioso de dengue argentino. Dicha construcción replicó y produjo partículas virales tanto en células de mosquito como de mamífero (Figura 22). Interesantemente, tanto los virus producidos por el clon infeccioso local, como los virus del aislamiento que le dio origen, mostraron placas de lisis muy grandes en comparación con otros aislamientos (Figura 21C). Este fenotipo es muy interesante, ya que la búsqueda de determinantes de patogenicidad y virulencia en el genoma viral es un área muy importante en el estudio de la virología del DENV. El conocimiento de los determinantes que llevan a un virus a causar daño celular podría ser útil para entender ciertos aspectos de la patogénesis causada por el DENV.

Inesperadamente, el Clon Salta mostró un crecimiento retrasado en células BHK respecto al Clon 16681 (Figura 22B). De acuerdo con este resultado, la construcción reportera mDV-R_{Salta}, tuvo una cinética de replicación del RNA más lenta que el virus mDV-R, derivado del Clon 16681 (Figura 23).

Actualmente, el Clon Infeccioso Salta está siendo utilizado en nuestro laboratorio para estudiar la respuesta a la infección en células dendríticas en comparación con otros aislamientos. Creemos que conociendo la secuencia completa del aislamiento, y contando con un clon infeccioso de DNA, será posible encontrar los determinantes que expliquen el mayor efecto citopático del mismo.

En este capítulo se describió el desarrollo y puesta a punto de un clon infeccioso de dengue local y de distintos virus reporteros. El empleo de estas herramientas genéticas es fundamental para avanzar en el conocimiento de los mecanismos básicos de la replicación de DENV. Además, la utilización de estos virus es imprescindible para la búsqueda de nuevos inhibidores de la replicación de virus, que pueden llevar al desarrollo de terapias antivirales de aplicación clínica.

Capítulo 2. Función de la N-glicosilación de la proteína de envoltura y pre-membrana del virus del dengue

Introducción

De las diez proteínas codificadas por el genoma de DENV, tres poseen el sitio consenso de N-glicosilación Asn-X-Ser/Thr: las proteínas estructurales de pre-membrana (prM) y de envoltura (E) y la proteína no estructural 1 (NS1).

Durante la traducción de los péptidos con sitios consenso de N-glicosilación, el precursor (Glc)₁(Man)₃(GlcNAc)₂ es transferido a la Asn, para luego ser procesado por las α -glucosidasas I y II del ER, antes de interactuar con las chaperonas calnexina y calreticulina para lograr un correcto plegado de la glicoproteína (Hebert, Foellmer et al. 1996).

En los flavivirus, la proteína prM posee sólo un sitio consenso de N-glicosilación, mientras que la proteína E posee uno o dos, los cuales varían considerablemente entre los distintos flavivirus. Así, mientras el sitio de glicosilación Asn 153 o Asn 154 es conservado en la mayoría de los flavivirus, la glicosilación del sitio Asn 67 es única para DENV (Adams, Broom et al. 1995; Heinz and Allison 2003). Sin embargo, ha sido reportado que la utilización de estos sitios de glicosilación pueden variar a través de los distintos serotipos virales de dengue (Johnson, Guirakhoo et al. 1994).

En WNV ha sido publicado que la ausencia del sitio de N-glicosilación de prM o E tiene un efecto negativo en la producción de partículas virales (Ilanna, Pierson et al. 2005). Además, la presencia del glicano en la posición 154 de E, ha sido encontrada en los aislamientos circulantes durante las epidemias, y ha sido asociada con la neuroinvasión del virus en modelos murinos (Lanciotti, Roehrig et al. 1999; Beasley, Whiteman et al. 2005).

De acuerdo con el rol de la N-glicosilación en la morfogénesis viral, ha sido reportado que el uso de inhibidores de la α -glucosidasa del ER, Castanospermina (CST) y Deoxynojirmicina (DNJ) afectan el plegado de prM y E, incidiendo en el ensamblado de la partícula viral y disminuyendo su infectividad, al perturbar el procesamiento de las glicoproteínas (Courageot, Frenkiel et al. 2000; Whitby, Pierson et al. 2005).

Análisis previos de la estructura cristalina de E de DENV y otros flavivirus indican que el glicano en la posición 153 se extiende a lo largo del dímero, cubriendo el péptido de fusión (Rey, Heinz et al. 1995; Modis, Ogata et al. 2003). Dada la proximidad del residuo N153 al

péptido de fusión, ha sido propuesto que el glicano podría contribuir a la estabilidad de la proteína, protegiendo a ésta de cambios conformacionales durante la maduración y secreción del virus. La estabilización del dímero por este oligosacárido es consistente con la pérdida de este sitio potencial de glicosilación en virus seleccionados en cultivo para fusionarse a un alto o bajo pH (Guirakhoo, Hunt et al. 1993).

La lectina DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM3 grabbing nonintegrin) ha sido identificada como un factor requerido para lograr una infección productiva en DCs inmaduras (Navarro-Sanchez, Altmeyer et al. 2003; Tassaneetrithep, Burgess et al. 2003). Esta es una observación muy relevante, ya que durante una infección natural se ha propuesto que las DCs residentes en la piel son las primeras células a las cuales el virus ingresa (Wu, Grouard-Vogel et al. 2000). DC-SIGN es una lectina tipo C tetramérica que se une a través de su dominio C-terminal de reconocimiento de carbohidratos con glicanos con alta manosa, presentes en la superficie de distintas glicoproteínas virales como la proteína gp120 de HIV y la proteína E2 de HCV (Altmeyer 2004). La proteína E de DENV, es la responsable de mediar la unión a la célula huésped y tiene un rol importante en la entrada y la unión del virus a la célula (Hung, Lee et al. 1999; Kuhn, Zhang et al. 2002; Mukhopadhyay, Kuhn et al. 2005). Además, ha sido propuesto que DC-SIGN actúa como un factor crítico que puede facilitar la interacción del virus con otros receptores celulares que permiten la entrada viral (Lozach, Burleigh et al. 2005).

Recientemente, ha sido publicada información estructural de la interacción de E con DC-SIGN a través de reconstrucciones de microscopía crioelectrónica entre E y el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) de DC-SIGN (Pokidysheva, Zhang et al. 2006). Esta reconstrucción muestra que el CRD se une al glicano 67 de la proteína E.

En este capítulo se caracterizaron mutantes de N-glicosilación de las proteínas E y prM utilizando un clon infeccioso de cDNA de DENV. Esto permitió determinar por primera vez, en el contexto del virus, la utilización de los sitios potenciales de N-glicosilación y los cambios de fenotipo asociados a la ausencia de estos.

Resultados

1) Función de la N-glicosilación de la proteína de envoltura del virus del dengue

Rol de la N-glicosilación de la proteína E del virus del dengue en células de mosquito

Con el objeto de determinar el rol de la glicosilación de la proteína de envoltura durante la replicación viral, se generaron virus mutantes con mutaciones en cada uno de los sitios potenciales de N-glicosilación, Asn-67 y Asn-153 de la proteína E. Estos mutantes fueron desarrollados cambiando la asparaginas por glutaminas en contexto del clon infeccioso de DENV2 16681, con el fin de producir genomas de RNA mutantes. Así, a través de mutagénesis sitio dirigida se generaron los clones infecciosos para los virus simple mutante (N67Q o N153Q), y el virus doble mutante (N67Q+N153Q) con ambos sitios de N-glicosilación mutados.

Se produjeron RNAs de los virus mutantes y del virus WT por transcripción *in vitro*. Seguidamente, se transfectaron los RNAs en células de mosquito (C6/36), y se analizó la replicación por IF, usando anticuerpos específicos contra DENV. Pasados siete días de la transfección se observó que cerca del 50 % de la monocapa era positiva para DENV (Figura 24A), este resultado sugiere la existencia de propagación de todos los virus mutantes.

Para confirmar que las mutaciones introducidas en los RNAs eran mantenidas en cultivo, se extrajo el RNA viral del sobrenadante de las células transfectadas y se lo utilizó para hacer ensayos de RT-PCR y secuenciación. De esta forma, se determinó que todos los virus mutantes producidos en cultivo conservaban las mutaciones originales.

Luego, se examinó si los dos sitios potenciales de N-glicosilación eran utilizados en células de mosquito. Para esto, se analizaron por WB extractos de células infectadas con los virus mutantes y WT. La movilidad de la proteína E de los mutantes N67Q y N153Q fue mayor que la de la proteína E WT, sugiriendo que ambas asparaginas son glicosiladas (Figura 24B). Para confirmar esta observación se determinó la sensibilidad de la proteína E de extractos celulares al tratamiento con la glicosidasa Endo H. El tratamiento resultó en un aumento de la movilidad tanto de la proteína E WT como la de los mutantes N67Q y N153Q, con un mayor cambio de movilidad en la proteína WT, la que presumiblemente tiene dos moléculas de glicano (en las posiciones 67 y 153). De acuerdo con esta

observación la proteína E del doble mutante N67Q•N153Q no mostró cambios luego del tratamiento con Endo H (Figura 24B). Es importante resaltar que se observó una menor cantidad de proteína E en las fracciones provenientes de los virus mutantes, en comparación con el virus WT. Esto sugiere que la falta de glicosilación de E podría disminuir los niveles de E en células infectadas.

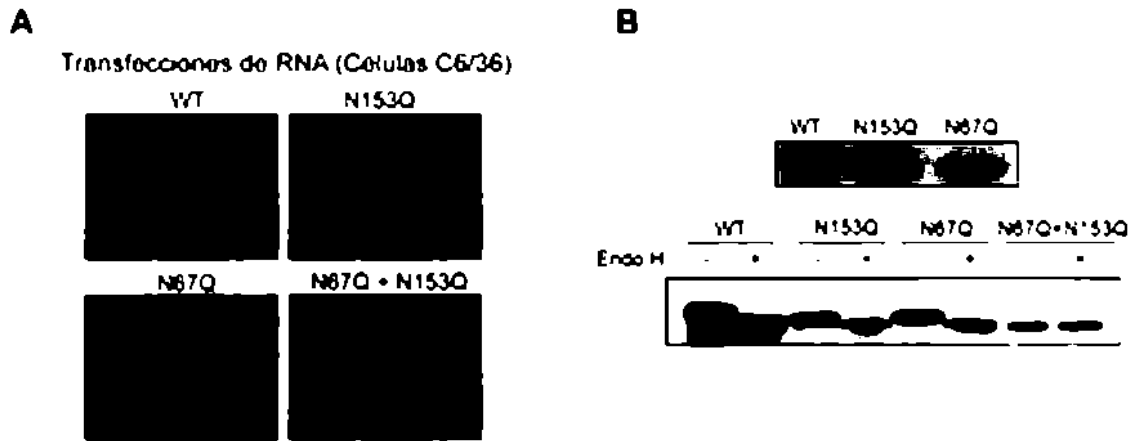


Figura 24. Replicación de los mutantes de glicosilación en células de mosquito. **(A)** Ensayos de IF en células C6/36 transfectadas con los RNAs de DENV WT y de los mutantes para los sitios de glicosilación Asn-67 (N67Q), Asn-153 (N153Q) y el doble mutantes (N67Q•N153Q). Las IF fueron realizadas a los 7 días post-transfección usando anticuerpos anti DENV2. **(B)** WB de la proteína E de DENV WT y de los mutantes de glicosilación utilizando lisados de células C6/36 a los 7 días post-infección. Los lisados fueron tratados con Endo H (+) o con buffer control (-).

Con el objeto de evaluar la propagación de los virus mutantes en células de mosquito, se generaron stocks virales de cada virus y se cuantificaron por PCR en tiempo real. Igual cantidad de copias de genoma de cada virus fueron utilizadas para infectar células frescas, para así analizar la replicación viral en función del tiempo por IF. Los resultados indican que los virus mutantes a los que les faltan uno o dos sitios de glicosilación replican y propagan en células C6/36 (Figura 25).

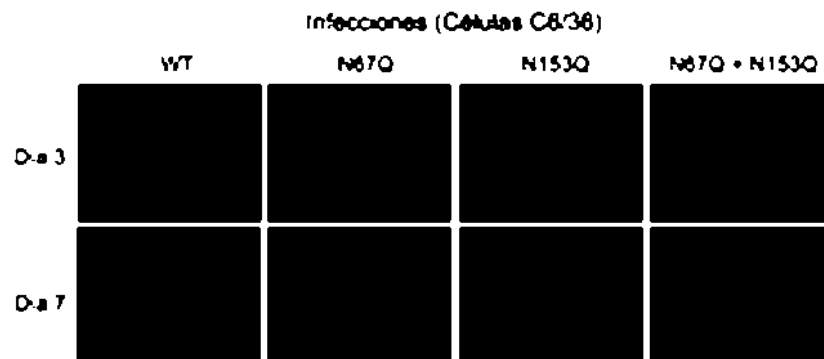


Figura 25. Infección con los virus mutantes de glicosilación en células de mosquito. Análisis de IF de células C6/36 a los 3 y 7 días post-infección, con el virus DENV WT y los mutantes de glicosilación N67Q, N153Q, y N67Q•N153Q. Se utilizaron anticuerpos anti DENV. La infección fue normalizada en base a la cantidad de RNA viral en el inoculo.

Requerimiento de la N-glicosilación de E para la replicación del virus del dengue en células de mamífero

Con el fin de investigar el requerimiento de la glicosilación de E durante la infección en células de mamífero, se transfectaron los RNAs del virus WT y los mutantes en células BHK. La replicación viral fue determinada por IF al día 5 post-transfección. A este tiempo se observó que casi toda la monocapa era positiva para el virus WT y el mutante N153Q, mientras que casi no se observaron células positivas para DENV en aquellas células transfectadas con los RNAs N67Q y N67Q+N153Q (Figura 26).

Transfecciones de RNA (Células BHK)



Figura 26. Transfección de los RNAs correspondientes a los mutantes de glicosilación en células BHK. Ensayos de IF de células BHK transfectadas con RNAs del virus DENV WT y de los mutantes de glicosilación de E. La IF fue realizada a los 5 días post-transfección usando anticuerpos anti DENV2.

Para caracterizar el defecto en replicación de los virus con la mutación N67Q en células de mamífero, se emplearon stocks virales generados en células C6/36. Se realizó esto, debido a que los virus llevando la mutación en el sitio 67 mostraron un defecto en la replicación en células BHK, pero no en C6/36. Así, se infectaron células BHK con los virus mutantes obtenidos en células de mosquito y se monitoreó la replicación por IF en función del tiempo. Iguales cantidades de genomas virales (cuantificados por PCR en tiempo real), fueron usados para la infección. Interesantemente, al día 1 post-infección fueron detectadas células positivas tanto para aquellas células infectadas con el virus WT como por el N67Q (Figura 27A). La señal positiva para antígenos de DENV observada para el mutante N67Q fue mantenida por dos días, pero luego ésta disminuyó en función del tiempo. Como se esperaba, la señal positiva en células infectadas con el virus WT se incrementó, tomando toda la monocapa al día 3 post-infección. El virus N153Q mostró un retraso en la replicación, sin embargo, al día 3 la señal de IF fue similar a la del virus WT.

Finalmente, el virus doble mutante N67Q+N153Q mostró un retraso en la replicación y al igual que el mutante N67Q, un defecto en propagación.

La utilización de los sitios de N-glicosilación en células de mamífero fue determinada por análisis de WB a partir de extractos celulares de células BHK infectadas con los virus producidos en células C6/36. La proteína E obtenida de células infectadas con el virus N153Q mostró una mayor movilidad que la proteína E WT (Figura 27B). Debido a que el mutante N67Q no replicó en células BHK, no fue posible realizar el análisis de este mutante por WB. Sin embargo, el tratamiento con la glicosidasa PNGasa F resultó en un cambio de movilidad tanto de la proteína WT como de la N153Q, indicando que el mutante N153Q aún tiene un sitio de glicosilación. Estos resultados sugieren que ambos sitios potenciales de glicosilación, Asn 67 y Asn 153, son utilizados en células de mamífero.

Los virus mutantes en la posición 67 replicaron en células de mosquito, las cuales se cultivan a 28 °C; pero no lo hicieron en células de mamífero, las cuales crecen a 37 °C. Para descartar un posible fenotipo dependiente de la temperatura para los mutantes N67Q, se infectaron células BHK crecidas a 28 °C con los virus mutantes. En estas condiciones, se observó el mismo defecto en replicación observado a 37 °C (resultado no mostrado). Esto indica que el defecto de replicación observado en células BHK, para los virus llevando la mutación N67Q, no es debido a un efecto de la temperatura.

En conjunto, estos resultados sugieren que la glicosilación de la Asn-67 tiene un rol fundamental en la replicación del DENV en células de mamífero, y que ambos sitios de N-glicosilación son utilizados por el virus para replicar en estas células.

El glicano en la posición N67 de la proteína E es necesario para la producción de partículas virales en células de mamífero

Debido a que no se observó propagación viral en células de mamífero infectadas con los virus llevando la mutación N67Q, se decidió analizar si estos virus mutantes producían partículas virales no infectivas. Para esto, se analizó por PCR en tiempo real el sobrenadante de células BHK infectadas a distintos tiempos con los virus N67Q y N67Q+N153Q. No se detectó RNA viral en el sobrenadante de las células infectadas con los virus mutantes en la posición 67; esto indica que la formación o la liberación de la partícula viral es impedida (Figura 28A). En contraste, el RNA del mutante N153Q fue detectado, sin embargo la cantidad de RNA viral para este virus fue de dos logaritmos menos que para el virus WT.

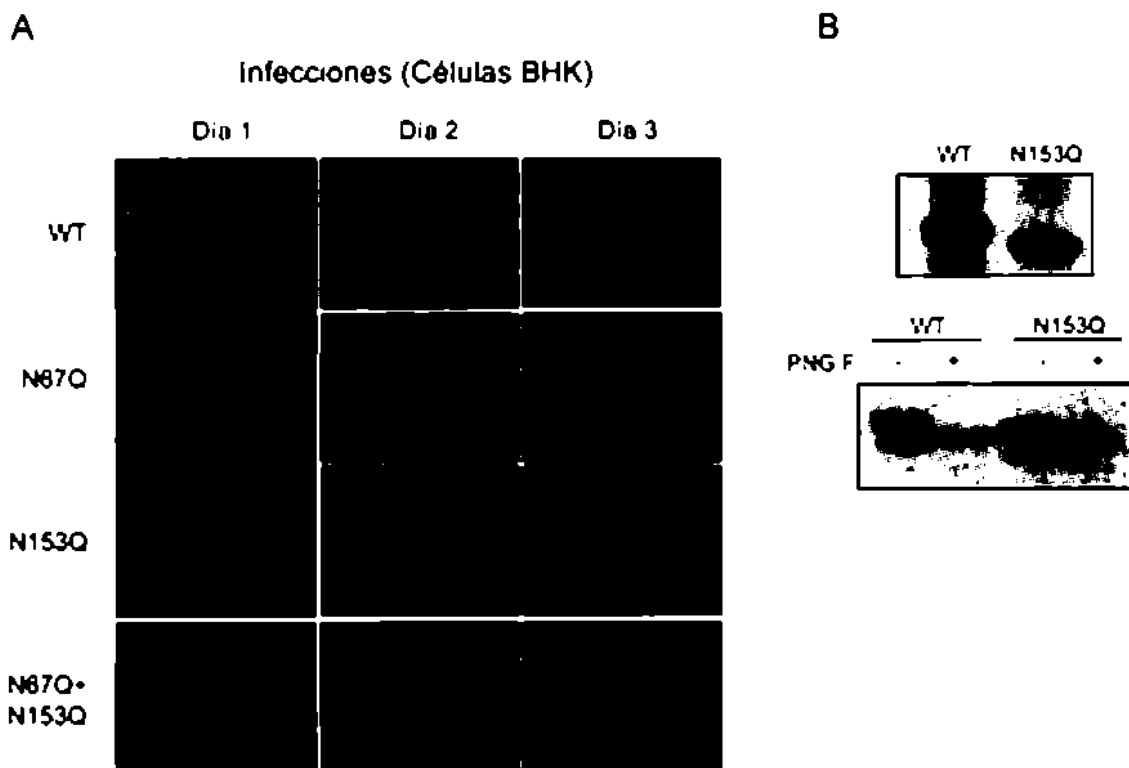


Figura 27. Infección de los virus mutantes de glicosilación en células BHK **(A)** Ensayo de IF de células BHK infectadas con los virus DENV WT y los mutantes de glicosilación de E, a los 1, 2 y 3 días post-infección, usando anticuerpos anti DENV2. La infección fue normalizada en base a la cantidad de RNA viral en el inoculo **(B)** WB de la proteína E WT y del virus N153Q a partir de lisados a los 3 días post-infección. Los lisados fueron tratados con PNGasa F (+) o buffer control (-)

Se analizó por WB la presencia de la proteína E en el sobrenadante de células infectadas en función del tiempo. La proteína E se acumuló en el medio de cultivo de células infectadas con el virus WT. Sin embargo, la infección con el mutante N67Q resultó en la ausencia de la proteína E (Figura 28B). Consistentemente con el retraso en la replicación del mutante N153Q observado por IF y por PCR en tiempo real, la acumulación de E en el medio de cultivo de células infectadas con el mutante N153Q fue reducida en comparación con el virus WT (Figura 28B).

Estos resultados indican que tanto las mutaciones N67Q y N153Q afectan la producción de partículas virales. Sin embargo, los efectos sobre la producción viral del virus N67Q fueron drásticos, ya que no se observó la producción de virus.

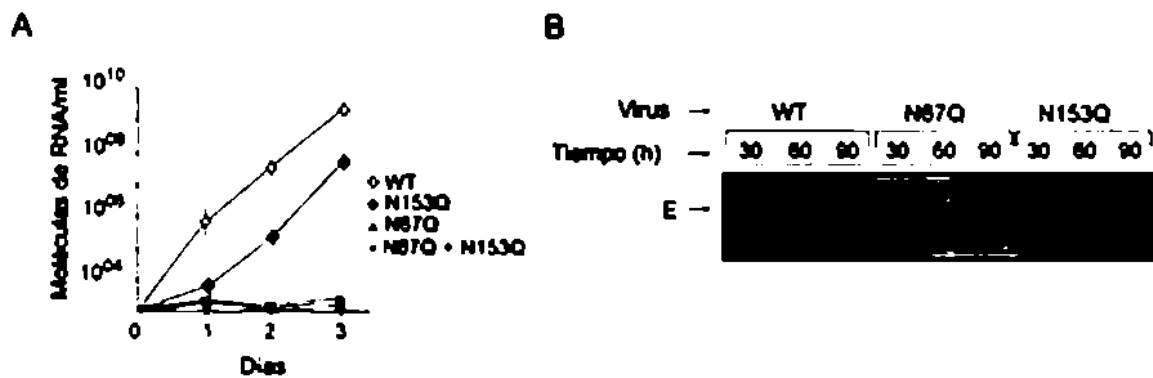


Figura 2B. Producción de partículas virales. (A) Cuantificación por PCR en tiempo real de la cantidad de partículas virales producidas en células BHK infectadas con los virus DENV WT y mutantes de glicosilación de E. La cantidad de copias de RNA viral por ml es mostrada a diferentes tiempos post-infección. Las barras indican el error estándar de las medias. (B) Secreción de la proteína E de células infectadas con el virus WT y los mutantes de glicosilación de E. El medio de células BHK infectadas fue utilizado para realizar ensayos de WB. Muestras de los virus DENV WT, N67Q y N153Q fueron colectados a diferentes tiempos post-infección.

La ablación del glicano 153 en la proteína E reduce la infectividad del virus

Para determinar el defecto de replicación del mutante N153Q en células de mamífero, se analizó si las partículas eran menos infecciosas o si eran menos eficientemente liberadas de células infectadas. Para esto, se infectaron células BHK con una misma MOI, con los virus WT y N153Q, y se determinó la relación infectividad/genomas de RNA (PFU/RNA) en los sobrenadantes. El medio de las células infectadas fue cosechado, y se cuantificó la cantidad de partículas infectivas por ensayo de placa de lisis. En paralelo, el RNA viral de los sobrenadantes fue purificado y cuantificado por PCR en tiempo real (Figura 29A). Como se observa, el mutante N153Q produjo placas de lisis más pequeñas que el virus WT.

Al cuantificar las diferencias entre la relación infectividad/genomas de RNA de los virus WT y N153Q, se observó que fueron 10 y 17 veces menores para el virus mutante, a los 2 y 4 días post-infección respectivamente. A los 2 días post-infección la cantidad de partículas virales (expresadas como moléculas de RNA/ml.) producidas por el virus N153Q fue similar que la del virus WT, pero la infectividad de las partículas mutantes fue 10 veces menor (Figura 29B). Estos resultados indican que aunque gran cantidad de partículas virales fueron liberadas de células infectadas con el virus N153Q, la infectividad fue reducida en comparación con el virus WT. Esta observación explica el defecto en propagación de los virus mutantes N153Q e indica un rol de la N-glicosilación en la posición 153 de E en la infectividad viral.

Una posible explicación de este fenotipo podría ser que los virus que llevan la mutación N153Q en E presentan una menor estabilidad. Con el fin de comparar la estabilidad de los virus N153Q y WT, se realizó un experimento de inactivación por calor. Para esto, se

incubaron iguales cantidades de stocks virales de ambos virus a 37 °C y se determinó la infectividad en función del tiempo (Figura 29C). Se observó una reducción similar en los títulos virales, sugiriendo una estabilidad comparable de las partículas virales N153 y WT en estas condiciones experimentales.

La N-glicosilación en el sitio N67 tiene un rol en la propagación viral en células de mamífero

Los virus mutantes para el sitio N67Q pudieron entrar a células BHK, pero no se produjeron partículas virales. Para estudiar con más detalle el requerimiento de la glicosilación del sitio 67 durante la replicación del virus se monitoreó la infección en células BHK por FACS. Para esto, se infectaron células con el virus WT y con el mutante N67Q con un inóculo viral normalizado por el número de partículas infectivas. El porcentaje de células infectadas fue determinado a diferentes tiempos post-infección.

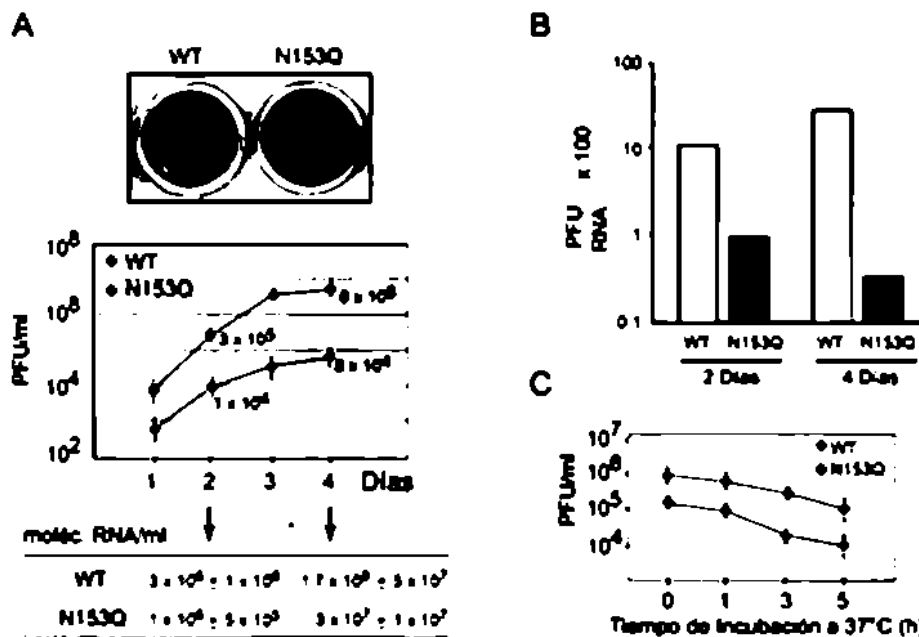


Figura 29. Infectividad del virus mutante N153Q en células BHK. (A) El panel superior muestra una imagen representativa del fenotipo de placa de lisas de los virus DENV WT y N153Q. El gráfico muestra las curvas de crecimiento de los virus DENV WT y N153Q en células BHK. Las células fueron infectadas con una MOI de 0.01 y los títulos fueron determinados a cada tiempo por ensayo de placa de lisas. Las barras indican el error estándar de las medias. A los 2 y 4 días, como indican las flechas, los sobrenadantes de las células infectadas fueron usados para extraer y cuantificar el RNA viral por PCR en tiempo real. \pm indican el error estándar (B) La relación de PFU/RNA obtenida en los sobrenadantes a los 2 y 4 días post-infección es mostrada para el virus WT y el mutante N153Q. (C) Comparación de la estabilidad de los virus WT y N153Q. Los stocks virales fueron incubados a 37 °C y cosechados a diferentes tiempos. La cantidad de partículas infectivas fue determinada por ensayo de placa de lisas en células BHK. Las barras de error indican el error estándar.

La cantidad de células infectadas fue similar para el virus WT y N67Q a las 18 y 24 hs post-infección (Figura 30). Sin embargo, luego de las 24 hs el porcentaje de células infectadas por el virus N67Q disminuyó marcadamente, mientras que el número de células infectadas con el virus WT se incrementó. Esta observación sugiere un rol esencial de la glicosilación de la Asn-67 durante la propagación del virus. Efectos similares fueron observados en células HeLa, Huh-7 y A549 infectadas con el virus N67Q (resultados no mostrados).

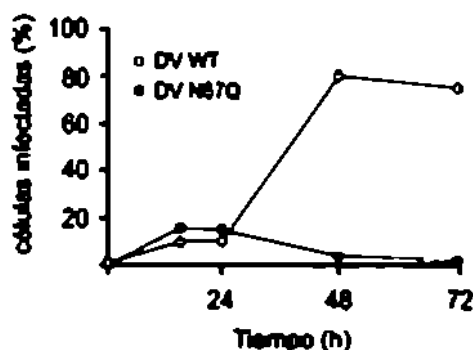


Figura 30. Infectividad del virus mutante N67Q. Células BHK fueron infectadas con iguales cantidades de partículas infectivas de los virus DENV WT y N67Q. Las células fueron cosechadas a las 18, 24, 48, y 72 hs post-infección, y la infectividad viral fue determinada por análisis de FACS usando el anticuerpo anti E mAb 4G2. Los valores graficados son las medias, y las barras indican el error estándar de tres experimentos independientes.

Los virus N67Q mostraron una infectividad reducida

La normalización del inóculo viral por la cantidad de partículas infectivas, como se hizo en el experimento anterior, podría ocultar diferencias en la infectividad viral. Entonces, para analizar un posible requerimiento del glicano 67 para una eficiente entrada del virus, se normalizó el inóculo por la cantidad de RNA viral. En este caso, células BHK y Vero, fueron incubadas con una igual cantidad de copias de genomas de los virus WT y N67Q. Con el fin de estudiar la unión de las partículas virales a las células, los antígenos virales fueron cuantificados por FACS luego de 2 hs de incubación a 4 °C. Se observó una disminución en la unión del virus N67Q a la célula de un 10% y 18%, tanto en células BHK y Vero respectivamente (Figura 31A).

Por otro lado, para estudiar la entrada viral y la producción de antígenos dentro de las células, la cuantificación se llevó a cabo luego de incubar a las células durante 24 hs a 37°C. Los resultados muestran que en la cuantificación de los antígenos virales a las 24 hs, la infectividad del virus N67Q fue de 2 a 3 veces menor que la observada para el virus WT (Figura 31B).

Estos resultados muestran que sin bien la N-glicosilación en la posición N67 tiene un rol en la interacción de la partícula viral con la célula y en la infectividad de las partículas, la mutación N67Q sólo afecta parcialmente estos procesos.

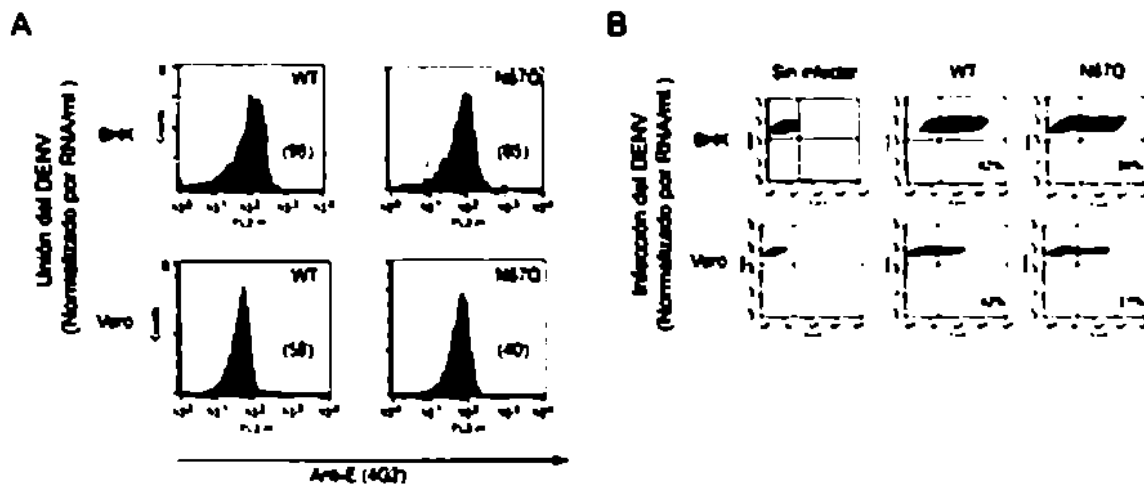


Figura 31. Infectividad del virus mutante N67Q. (A) Unión de los virus DENV WT y N67Q a la célula. Análisis de FACS realizados para detectar antígenos virales asociados a células BHK y Vero. Las células fueron tratadas con medio de cultivo control (color gris) o con 50 genomas de los virus DENV WT o N67Q (color negro). Las células fueron incubadas a 4 °C y analizadas luego de 2 hs. Los números entre paréntesis indican la media de las intensidades de fluorescencia. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. (B) Infección de células BHK y Vero con los virus DENV WT y N67Q. Las células fueron infectadas con cantidades equivalentes de genomas de los virus DENV WT y N67Q. A las 24 hs post-infección las células fueron inmunomarcadas para E y analizadas por FACS. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

La mutación N67Q impide la secreción de la proteína E en células de mamífero

Para determinar si la síntesis o la secreción de la proteína E en células de mosquito y mamífero eran afectadas por la presencia o ausencia de la N-glicosilación, se examinó la acumulación y la secreción de las proteínas E de los virus WT y N67Q en células C6/36 y BHK.

Para esto, la región codificante de prM y el dominio extracelular de E (sE), comprendidos entre los aminoácidos 115 y 674 de la proteína viral se produjeron usando el sistema de expresión del virus Semliki Forest (SFV). La presencia de sE fue evaluada en extractos celulares y en el sobrenadante por WB, usando el anticuerpo mAb 1D4, dirigido contra el epítopo C9 introducido en el dominio C-terminal de sE.

En células C6/36, tanto los dominios sE WT y N67Q fueron producidos y secretados eficientemente (Figura 32A). En contraste, mientras las proteínas E WT y N67Q fueron detectadas en el citoplasma de células BHK, la secreción de sE N67Q fue impedida, ya que no se detectó sE en el sobrenadante. La secreción del mutante N153Q mostró una leve disminución en comparación con la secreción de la proteína WT. Estos resultados

confirman el rol diferencial de la glicosilación del sitio N67 en células de mosquito y de mamífero observado en los experimentos *in vivo* (Figuras 25 y 27).

Para analizar en detalle el defecto de secreción del virus mutante N67Q, se realizó un experimento de pulso y caza. La cinética de secreción de las proteínas E WT y mutantes fue seguida tanto en células de mosquito como de mamífero. En células C6/36, las proteínas E WT, N67Q y N153Q fueron detectadas en los sobrenadantes de células infectadas una hora después del pulso. Si bien en células BHK, las proteínas E WT y N153Q fueron eficientemente producidas y secretadas 3 horas después del pulso, la secreción de la proteína E N67Q fue dramáticamente reducida en comparación con la secreción de la proteína E WT (Figura 32B). La cuantificación de las proteínas inmuno precipitadas en células BHK a diferentes tiempos luego del pulso, indican que la secreción de la proteína E N67Q se redujo cerca de un 90% comparada con la proteína E WT (Figura 32C). Estos resultados sugieren que la N-glicosilación del sitio 67 de la proteína E es necesaria para la secreción de la proteína E en células de mamífero, pero no en células de mosquito.

El virus reportero permite caracterizar defectos en la replicación del virus N67Q

Con el fin de definir la eficiencia de los distintos pasos de replicación del virus N67Q en células de mamífero, se empleó el virus reportero bicistrónico (DV-R), presentado en el Capítulo 1 de esta tesis. Así, para estudiar el defecto de los virus mutantes en la posición N67, la sustitución N67Q fue introducida en el cDNA del DV-R.

Se transfectaron células C6/36 con los RNAs N67Q DV-R y DV-R WT, y se produjeron partículas virales. Los stocks de los virus reporteros se utilizaron para infectar células BHK y analizar la replicación viral midiendo la actividad luciferasa. Previo a la infección, se cuantificó el número de genomas por PCR en tiempo real, con el fin de infectar con iguales cantidades de los virus WT y N67Q. Se observaron similares valores de actividad luciferasa para ambos virus hasta las 48 hpi. Sin embargo, la actividad luciferasa del virus mutante disminuyó dramáticamente luego de las 60 hpi en comparación con el virus WT (Figura 33). Estos resultados indican que la traducción y la síntesis del RNA viral no son afectadas significativamente por la falta del glicano en la posición 67, mientras que la propagación viral de este mutante es indetectable en células BHK.

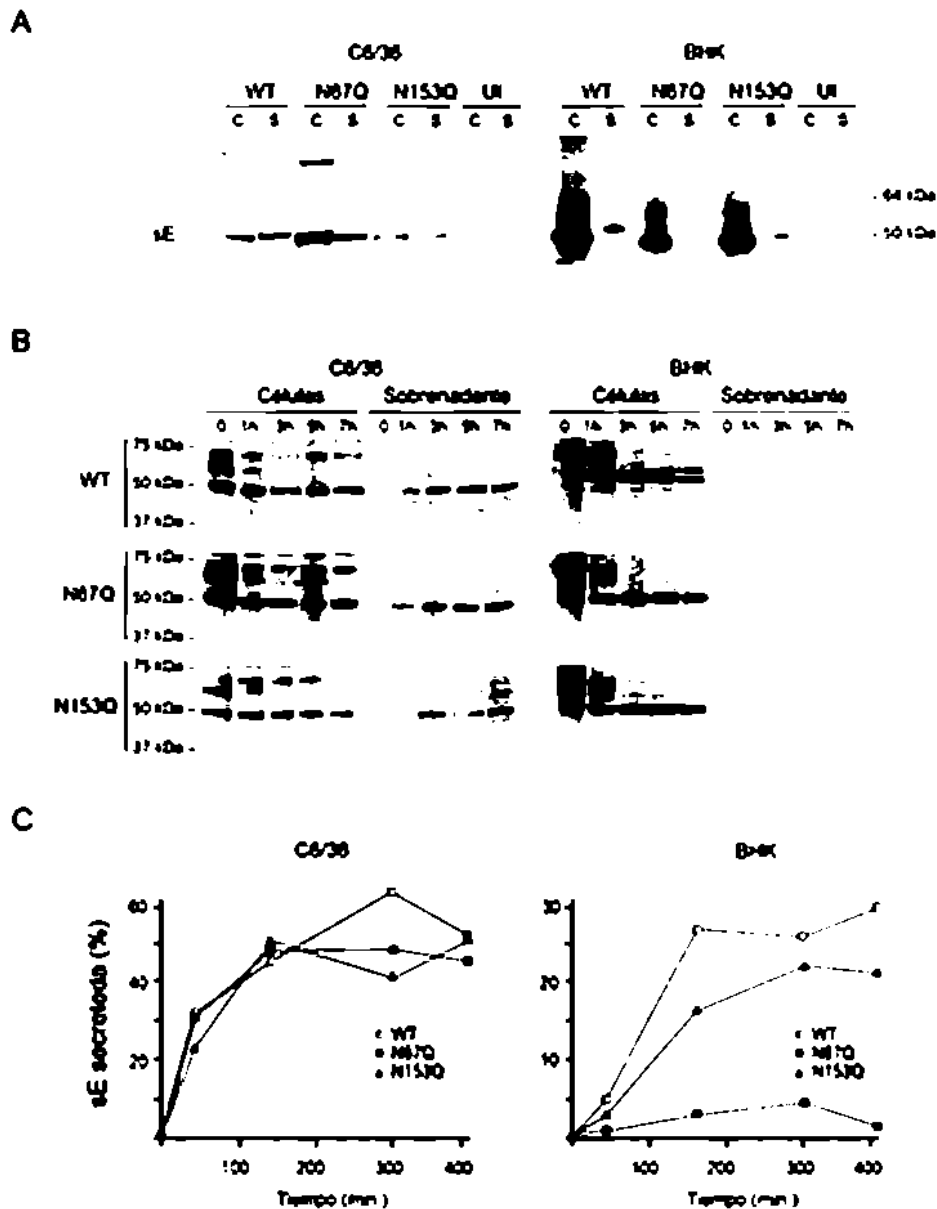


Figura 32. Secreción de la proteína E expresada en células de mosquito y de mamífero. Las formas solubles de la proteína E WT y de los mutantes de glicosilación fueron expresadas usando el sistema de SFV tanto en células C6/36 como BHK. (A) WB de las proteínas E WT y mutantes de lisados celulares (C) y de los sobrenadantes (S), como es indicado arriba de cada gel. Ensayo realizado luego de 1 día post-infección con el SFV. Los extractos y sobrenadantes de células no infectadas (UI) fueron usadas como controles negativos. La proteína E fue detectada usando el mAb 1D4 dirigido contra el epítipo C9 introducido en el extremo C-terminal de E. (B) Cinética de procesamiento y secreción de la proteína E de DENV en células BHK y C6/36. Las proteínas E WT y mutantes de glicosilación fueron marcadas con ^{35}S Cys/Met. Los extractos citoplasmáticos y los sobrenadantes fueron inmunoprecipitados usando el mAb 1D4 a las 1, 3, 5 y 7 hs post-infección con SFV. (C) Cuantificación de la proteína E secretada mostrada en el panel B. La cantidad de la proteína E WT y mutantes fue determinada en función del tiempo usando el programa ImageJ. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

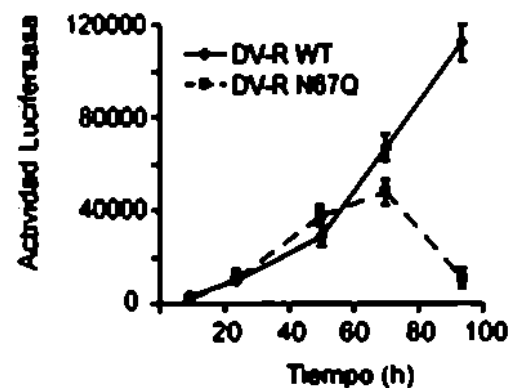


Figura 33. Uso del virus reportero para estudiar el defecto en propagación del mutante N67Q. Medida de la actividad luciferasa de extractos citoplasmáticos de células BHK infectadas con los virus DV-R WT y DV-R N67Q. Los valores indican la media y el error estándar de tres experimentos independientes.

La glicosilación de la proteína E en la posición 67 incrementa la entrada viral en células que expresan DC-SIGN

Para estudiar si la glicosilación de la Asn 67 es requerida para el aumento de la infección mediada por DC-SIGN, células Raji, Raji-DC-SIGN y dendríticas (DCs) fueron infectadas con los virus WT y N67Q. La producción de antígenos intracelulares fue cuantificada por FACS a las 24 hpi, usando el anticuerpo mAb 4G2 dirigido contra la proteína E. Las células Raji parentales fueron poco susceptibles a la infección por el virus. Sin embargo, la infectividad se incrementó por la expresión exógena de DC-SIGN en esta línea celular. Mientras el 95,9% de las células Raji expresando DC-SIGN fueron infectadas por el virus WT, sólo el 0,4% de las células Raji parentales fueron infectadas (Figura 34A).

Para analizar la contribución de la glicosilación de la Asn 67 sobre el aumento de la infectividad viral dependiente de DC-SIGN, se compararon las infectividades de los virus WT y N67Q en células Raji-DC-SIGN. Para esto se normalizó el inóculo viral por la infectividad en células Raji parentales. Interesantemente, se observó que mientras el virus WT infectó un 95,9% de las células expresando DC-SIGN, el virus N67Q mostró sólo una infectividad del 23,7%. Esto indica que el glicano 67 tiene un rol positivo en la infectividad mediada por DC-SIGN.

Para investigar la capacidad de los virus WT y N67Q para infectar DCs, se obtuvieron estas células a partir de monocitos humanos. Se infectaron DCs con diferentes diluciones de los stocks virales normalizados por su infectividad en células Raji. Como se indica, entre un 95% y un 90% de las DCs fueron infectadas por el virus WT a una MOI de 0,5 y 0,05 respectivamente. En contraste, la exposición de las DCs con el virus N67Q resultó en una infectividad del 40% y 50% para una MOI de 0,5 y 0,05 respectivamente. A bajas concentraciones de virus, las DCs casi no fueron infectadas por el virus N67Q, mientras

que el virus WT mostró una infectividad del 40% en estas condiciones (Figura 34B). Estas observaciones indican que el glicano en la posición 67 aumenta la infectividad en DCs.

Además, se determinó la cantidad de células Raji-DC-SIGN infectadas con los virus WT, N67Q y N153Q en función del tiempo. Ambos mutantes de glicosilación presentaron una disminución de la infectividad a las 24 hpi en comparación con el virus WT. Sin embargo, luego de las 40 hpi, mientras la cantidad de células infectadas con el mutante N153Q fue similar a la cantidad de células infectadas con el virus WT, la cantidad de células infectadas con el virus N67Q disminuyó, en concordancia con los defectos de propagación observados para este mutante en otras células de mamífero (Figura 34C).

En su conjunto, estos resultados muestran que el glicano 67 es necesario para la infección mediada por DC-SIGN y que tiene un efecto positivo para la infección en DCs.

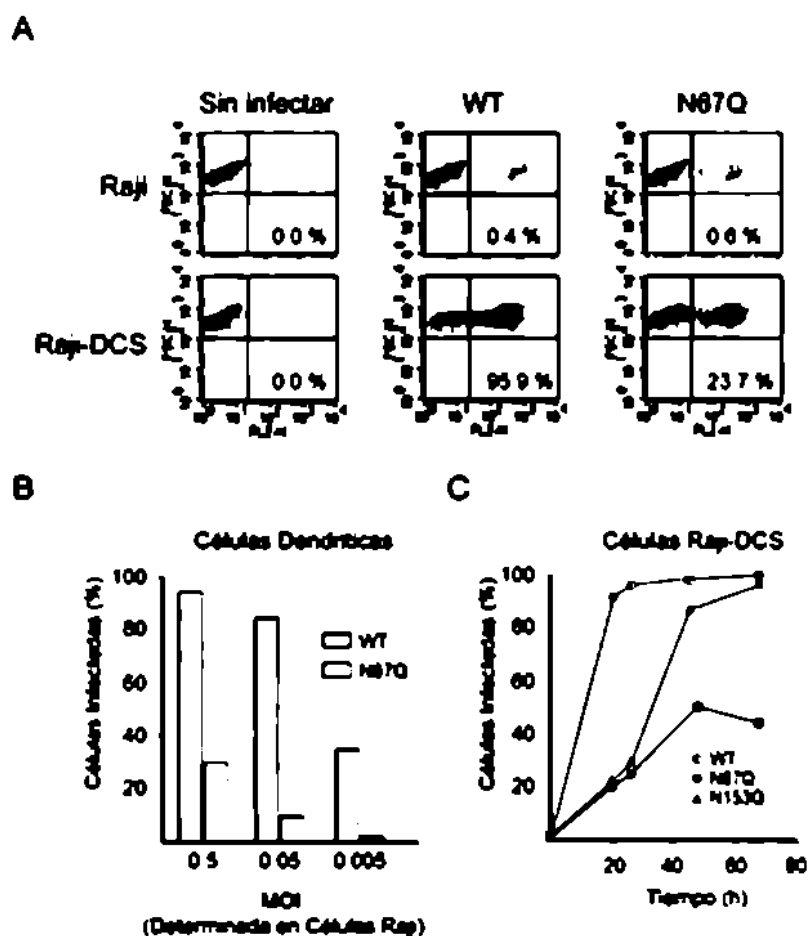


Figura 34. La glicosilación en el sitio N67 incrementa la entrada viral mediada por DC-SIGN. (A) Células Raji y Raji DC-SIGN fueron infectadas con iguales cantidades de partículas infecciosas de los virus DENV WT y N67Q. Las células fueron marcadas para E a las 24 hs post-infección y analizadas por FACS. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. (B) Células dendríticas fueron infectadas con los virus DENV WT y N67Q a diferentes MOIs, marcadas para E y analizadas por FACS a las 24 hs post-infección. (C) Curvas de replicación de los virus DENV WT, N67Q y N153Q en células Raji expresando DC-SIGN. Las células fueron infectadas con cantidades equivalentes de partículas infecciosas de cada virus. La infección viral fue cuantificada por FACS a las 18, 48 y 72 hs post-infección. Los valores son las medias de dos duplicados. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

2) Función de la N-glicosilación de la proteína prM del virus del dengue

Requerimiento de la N-glicosilación de la proteína prM en la replicación del virus del dengue en células de mosquito y mamífero

Con el fin de determinar el rol de la N-glicosilación en la proteína prM durante la replicación viral se generó un virus mutante para el sitio potencial de N-glicosilación, cambiando la asparagina 69 por glutamina (N69Q). Se produjeron RNAs de este mutante y se transfectaron en células BHK y C6/36. Se monitoreó la replicación viral a través de ensayos de IF a los 3 días post-transfección (Figura 35, panel superior). Como se esperaba, se observó una gran cantidad de células con señal positiva para DENV en aquellas transfectadas con RNAs WT. Sin embargo, se observó una menor cantidad de células con inmunofluorescencia positiva (tanto en células BHK y C6/36) cuando la transfección se realizó con los RNAs mutantes N69Q.

Para determinar si los virus N69Q eran capaces de propagar, se tomaron los sobrenadantes de las células transfectadas y se infectaron células frescas (Figura 35, panel inferior). No se observó señal positiva para DENV tanto en células BHK como en C6/36; sin embargo se detectó una monocapa completamente infectada con el virus WT. Estos resultados sugieren que la mutación N69Q afecta la producción de partículas virales en células de mamífero y de mosquito.

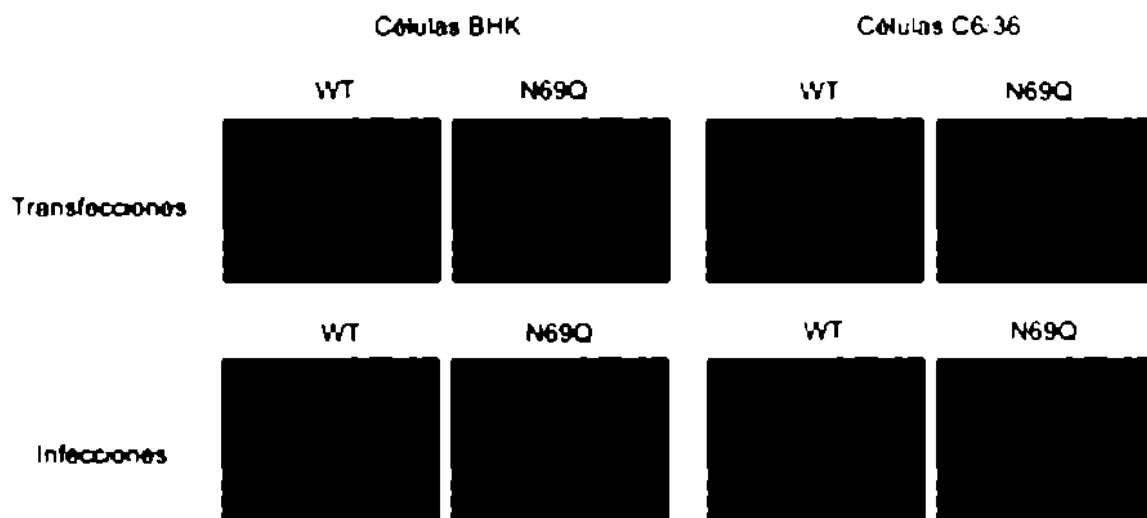


Figura 35. Replicación del virus mutante de N-glicosilación de prM N69Q. Células BHK y C6/36 fueron transfectadas con RNAs de los virus DENV WT. La replicación viral se determinó por IF a los 3 días post-transfección. Los sobrenadantes de las células transfectadas se utilizaron para infectar células frescas y realizar IF a los 2 días post-infección. Se utilizaron anticuerpos anti-DENV2.

La mutación N69Q afecta la producción de la proteína prM

Debido a que los virus llevando la mutación N69Q no fueron capaces de propagar en células BHK y C6/36, resultó difícil la caracterización de estos mutantes.

Con el fin de determinar si prM se encuentra N-glicosilada, y si la mutación N69Q impide su glicosilación, se realizó el marcaje metabólico de células transfectadas con los RNAs WT y N69Q, utilizando [³⁵S]Cys/Met. Seguido esto, se realizó la inmunoprecipitación (IP) por medio de un anticuerpo que reconoce tanto a la proteína E como prM. Como se observa, luego de la corrida en un gel de poliacrilamida y el revelado en una placa radiográfica, se detectaron dos bandas discretas con pesos correspondientes a las proteínas E y prM (Figura 36A). Luego del tratamiento con la glicosidasa PNGasa, se observó una mayor movilidad tanto de la proteína E como de prM. Este resultado concluye que la proteína prM es N-glicosilada durante la replicación viral en el contexto de nuestro clon infeccioso.

Con el objeto de determinar si la mutación N69Q impide la N-glicosilación de prM, se realizó la IP de extractos de células transfectadas con el mutante N69Q (Figura 36B). No se observó ninguna banda correspondiente a prM, pero sí a la proteína E. Este resultado sugiere que la mutación en el sitio de glicosilación N69, afecta la producción o estabilidad de la proteína prM.

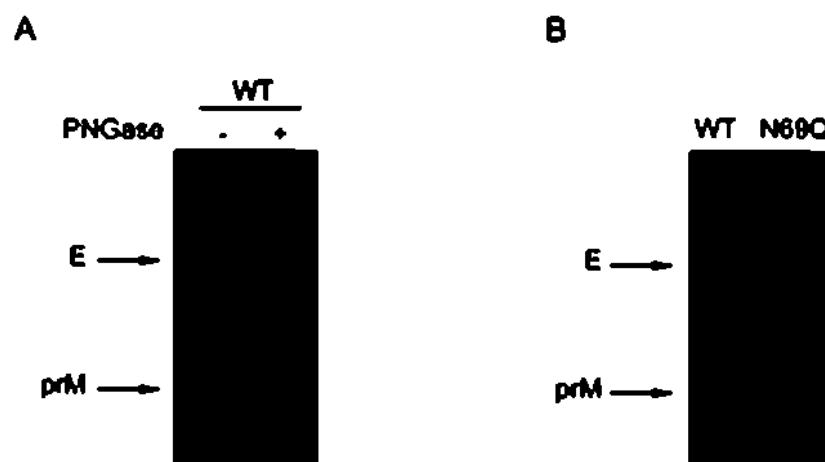


Figura 36. Efecto de la mutación N69Q sobre prM. Células BHK transfectadas con los RNAs DENV WT o N69Q fueron marcadas con [³⁵S]Cys/Met durante 4 hs, inmunoprecipitadas con anticuerpos anti DENV2 y analizadas por electroforesis. (A) Los lisados inmunoprecipitados de células transfectadas con RNAs del DENV WT fueron tratados con PNGasa (-) o con buffer control (+). (B) Los lisados inmunoprecipitados de células transfectadas con los RNAs DENV WT o N69Q fueron analizadas por electroforesis. Las flechas a la izquierda indican las posiciones de las proteínas virales detectadas.

La mutación N69Q afecta la formación o salida de las partículas virales

Con el objeto de caracterizar el defecto de los virus N69Q, se clonó la mutación en el virus reportero mDV-R, descrito en el Capítulo 1 de esta tesis. Se transfectaron células con

RNAs mDV-R llevando la mutación N69Q, y se observó que la mutación no afectó ni la traducción (6 hpt), ni la replicación (48 hpt) del virus (Figura 37A). Con el fin de evaluar la producción de partículas infectivas, se cosecharon los sobrenadantes y se infectaron células frescas. No se detectó actividad luciferasa en aquellas células infectadas con sobrenadantes de células transfectadas con los RNAs llevando la mutación N69Q. Por el contrario, sí se detectó actividad luciferasa en aquellas células infectadas con el virus WT (Figura 37B). Este resultado demuestra que el sitio de glicosilación N69, es esencial para la formación o salida de las partículas virales.

Con el fin de estudiar la capacidad de la proteína prM WT de trans-complementar la función de la proteína prM N69Q defectuosa, se realizó la cotransfección del RNA del virus reportero mutante mDV-R.N69Q con el RNA del DENV WT. Se logró una reversión parcial del fenotipo producido por la mutación N69Q, ya que se detectó la producción de partículas virales a través de la medición de la actividad luciferasa (Figura 37B). Este resultado sugiere que la proteína prM WT suministrada en *trans* es capaz de revertir el fenotipo mutante y producir partículas virales infectivas.

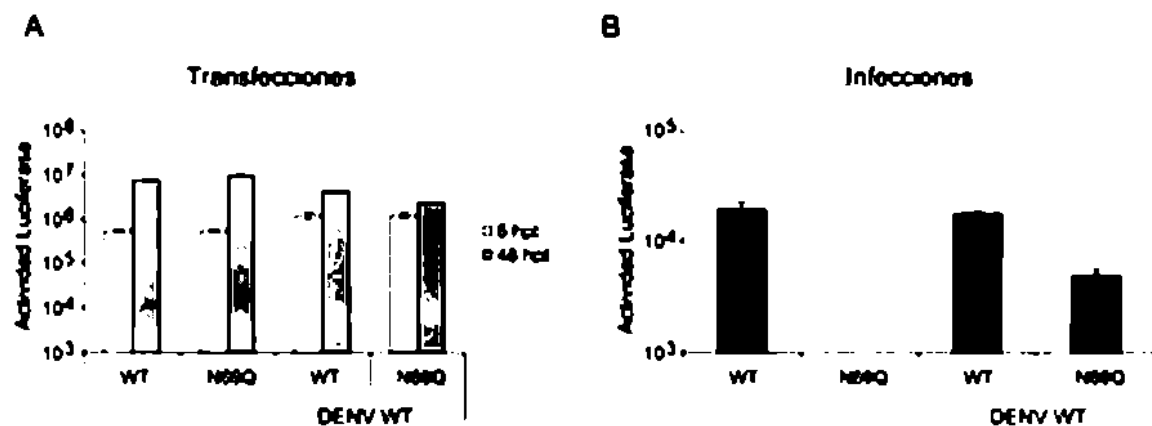


Figura 37. Estudio del efecto de la mutación N69Q sobre la replicación viral utilizando el virus reportero mDV-R. (A) RNAs de los virus mDV-R WT y mDV-R N69Q fueron transfectados en células BHK, en presencia o ausencia de RNAs de DENV WT. La replicación de los virus fue evaluada a través de la medida de actividad luciferasa a las 6 y 48 hs post-transfección. (B) Los sobrenadantes de las transfecciones del panel A, fueron utilizados para infectar células frescas. La medición de la actividad luciferasa se realizó a las 48 hs post-infección.

Discusión

En este Capítulo, se desarrollaron y caracterizaron mutantes de N-glicosilación para las proteínas E y prM del DENV.

Respecto a la N-glicosilación de la proteína E, se encontró que los sitios potenciales N67 y N153 son utilizados tanto en células de mamífero como de mosquito. Asimismo, se demostró que la N-glicosilación de la proteína E de DENV tiene un rol diferencial en células de mosquito y de mamífero. Mientras que los virus mutantes para el sitio N67 propagaron en células de mosquito, estos virus tuvieron graves defectos de propagación en células de mamífero.

Si bien ambos sitios de glicosilación fueron utilizados en células de mosquito, nuestros resultados muestran que esta modificación de E no es esencial para la replicación del virus en estas células, ya que stocks virales de todos los mutantes pudieron ser obtenidos en células C6/36. Sin embargo, la mutación N67Q resultó en un dramático efecto en la producción de partículas virales en células de mamífero, ya que no se detectaron virus N67Q en el sobrenadante de las células infectadas. Además, la falta del glicano en la posición 67 disminuyó, tanto el pegado de la partícula viral a la célula como la infectividad de esta en células Vero y BHK. Asimismo, se estableció por primera vez en un experimento *in vivo* el rol positivo del glicano 67 en la infectividad viral mediada por la lectina DC-SIGN. Importantemente, este rol también fue demostrado en células DCs, blanco de una infección natural por el DENV.

Los defectos de replicación encontrados en el mutante N67Q parecieran estar asociados a la falta del glicano más que a la introducción de una sustitución aminoacídica deletérea, ya que los virus N67Q fueron funcionales en células de mosquito.

Además, se caracterizó el sitio de N-glicosilación para prM. Se encontró que este sitio es utilizado durante la infección viral, y que su presencia es esencial tanto para la propagación viral en células de mamífero como de mosquito.

De acuerdo con nuestros resultados, nuevos estudios han demostrado que los dos sitios de N-glicosilación de la proteína E del DENV son utilizados en todos los serotipos virales, tanto en células de mamífero como de mosquito (Hacker, White et al. 2009).

Recientemente ha sido publicado que la ausencia de los glicanos 67 y 153 de la proteína E de DENV, tiene un efecto benéfico en la infectividad viral en células C6/36, pero afectan la producción de partículas virales en estas mismas células (Lee, Leang et al. 2010). Este

resultado explica la menor cantidad de proteína E observada por WB para todos los mutantes de glicosilación en células C6/36 (Figura 24B).

Estudios realizados empleando sistemas *in vivo* concuerdan con nuestras observaciones. En estos, se reportó que virus con la mutación N67Q Inoculados intratorácicamente en mosquitos *Aedes aegypti* replicaron en forma similar al virus WT (Bryant, Calvert et al. 2007).

Asimismo otro trabajo recientemente publicado, sugiere que el efecto deletéreo producido por la ablación de glicano en la posición 67 puede ser atenuado por el tipo de modificación aminoacídica realizada. Se observó que el defecto asociado a la falta del glicano 67 pudo ser parcialmente suprimido a través de pseudo-reversiones que generaron cambios de aminoácidos que no siempre generaron un nuevo sitio de glicosilación (Lee, Leang et al. 2010). Interesantemente, estos cambios ocurrieron en el DII de la proteína E, el cual tiene un importante impacto en la virulencia y la unión del virus a la célula (Gualano, Pryor et al. 1998; Lee, Wright et al. 2006).

Nuestros resultados sugieren que los requerimientos en la glicosilación de E para la replicación del DENV en células de mamífero y mosquito podrían deberse a diferentes vías de procesamiento y secreción de E en ambos tipos celulares. Esta hipótesis está sustentada en el hecho de que existen diferentes enzimas metabólicas involucradas en el procesamiento de los N-glicanos en células de insecto y de mamífero (Tomiyama, Narang et al. 2004). En línea con esto, nuestros resultados indican que las diferencias observadas no se deben a un fenotipo asociado a la temperatura, ya que en células de mamífero cultivadas a la misma temperatura a la cual crecen las células de mosquito (28°C) la propagación viral fue indetectable, en forma similar a lo observado a 37°C. De acuerdo con nuestra hipótesis, en un trabajo reciente en el cual se analizó la composición de los glicanos presentes en la proteína E de los distintos serotipos de DENV; se observó que los glicanos provenientes de células de mosquito tienen una mezcla de glicanos con alta manosa y paucimansa y los provenientes de células de mamífero presentan una mezcla de glicanos de alta manosa con glicanos complejos (Hacker, White et al. 2009).

Los N-glicanos juegan un rol importante en el plegado de proteínas ya que sirven como ligandos de las chaperonas calnexina y calreticulina presentes en el ER (Parodi 2000). De acuerdo a nuestros resultados, podría ser posible que las células de insecto posean una vía de secreción de E independiente de la N-glicosilación, mientras que en células de mamífero, factores celulares podrían ser necesarios para reconocer el glicano en la posición 67 para un plegado apropiado de E. Cabe destacar que ha sido descrito que la

proteína E de DENV interactúa con las chaperonas bip, calnexina y calreticulina en células Vero (Limjindaporn, Wongwiwat et al. 2009). Además, la disminución de estas proteínas a través de experimentos de RNAi fue asociada con una disminución en la producción viral (Limjindaporn, Wongwiwat et al. 2009). Sería necesario realizar experimentos similares en células de mosquito, para determinar la importancia de estas chaperonas en la replicación del virus en este tipo celular.

Se observó que la Asn 153 es glicosilada tanto en células de mamífero como de mosquito. Ha sido publicado anteriormente, que los pasajes seriados del virus DENV3 en células de insecto seleccionan un cambio en la Thr 155, resultando en la pérdida de glicosilación del sitio Asn 153 (Lee, Weir et al. 1997). Estos resultados sugieren que el glicano en esa posición podría no ser ventajoso para la replicación en células de insecto, lo cual está de acuerdo con nuestros resultados con el virus N153Q; ya que este virus replicó eficientemente en células C6/36. Al contrario, un efecto deletéreo fue observado en la infectividad del virus N153Q en células BHK, ya que estos mutantes mostraron defectos en la producción de partículas virales y en su infectividad (Figura 29). La estructura de E para el DENV y otros flavivirus muestra que el glicano 153 cubre el péptido de fusión (Rey, Heinz et al. 1995; Mukhopadhyay, Kim et al. 2003; Modis, Ogata et al. 2004), lo que apoya nuestro análisis acerca de la función de este glicano. Además, se observó la pérdida del glicano 153 en virus seleccionados para fusionarse a bajos o altos pHs (Gulrakhoo, Hunt et al. 1993). En conjunto, los resultados evidencian un rol de este glicano en el proceso de fusión de membranas durante la infección. Así, la baja infectividad determinada para el virus N153Q podría ser explicada por un posible rol de este glicano en la modulación del proceso de fusión. Resultados similares fueron obtenidos en trabajos posteriores, en los cuales asocian la pérdida del glicano 153 a una disminución del título viral y de la infectividad (Lee, Leang et al. 2010).

En trabajos realizados en otros flavivirus se ha encontrado que la glicosilación de la Asn 154 de WNV y de TBV (correspondiente a la Asn 153 de DENV) también tiene un rol positivo en la producción de partículas virales (Lorenz, Kartenbeck et al. 2003; Hanna, Pierson et al. 2005). Sin embargo, en contraste con nuestras observaciones con DENV, la presencia del glicano en la posición 154 en WNV reduce la infectividad viral tanto en células BHK como C6/36 (Hanna, Pierson et al. 2005).

Los resultados presentados indican que el glicano en la posición 67 de E aumenta la entrada viral mediada por DC-SIGN. El mutante N67Q mostró un defecto para infectar células dendríticas Raji-DC-SIGN. Esta observación está de acuerdo con un trabajo donde

se muestra que el CRD de DC-SIGN interacciona con el glicano en la posición 67 de E (Pokidysheva, Zhang et al. 2006). Además, la introducción foránea del sitio de glicosilación en la posición 67 en la proteína E de WNV ha mostrado aumentar la utilización de DC-SIGN durante la entrada del virus a la célula (Davis, Mattei et al. 2006).

Se encontró que la falta de la Asn 67 no impidió la infección del virus en células dendríticas o Raji DC-SIGN, sugiriendo la contribución de otro carbohidrato al aumento de la infección mediado por DC-SIGN. Los virus N153Q también mostraron una reducida infectividad en células Raji DC-SIGN; sin embargo, no es claro si el glicano en la posición 153 directamente contribuye a la entrada mediada por DC-SIGN, o si la baja infectividad de este mutante se debe a un defecto en la fusión de membranas previamente mencionado. Utilizando el virus doble mutante N67Q+N153Q, se observó que si bien la infectividad en células Raji DC-SIGN disminuyó la entrada viral, esta no fue impedida por completo (resultados no mostrados). Esto sugiere que quizás la presencia de prM inmadura en la partícula viral podría tener un rol en la entrada del DENV mediada por DC-SIGN. De acuerdo con esto, usando el WNV fue demostrado que la presencia de un sitio de glicosilación en prM o E, es suficiente para permitir la infección mediada por DC-SIGN o L-SIGN (Davis, Nguyen et al. 2006). Lamentablemente, no se pudo testear en DENV el efecto de la glicosilación de prM en la infección mediada por DC-SIGN, debido a que la ausencia del glicano 69 en prM fue letal para la propagación viral en todas las condiciones testeadas.

Recientemente fue publicado un trabajo en el cual se describe que el receptor de manosa (MR) presente en macrófagos interacciona con la proteína E del DENV y media la infección. Interesantemente, esta interacción es impedida luego del tratamiento de E con glicosidasas (Miller, de Wet et al. 2008). Estos resultados sugieren que los glicanos presentes en E, podrían mediar la entrada del virus a través del MR durante la infección en macrófagos.

Se publicó que los inhibidores de la α -glucosidasas del ER, CSP y DNJ, afectan la replicación del DENV, ya que alteran al plegado de la glicoproteínas prM y E en células de neuroblastoma (Courageot, Frenkiel et al. 2000). El fenotipo reportado con el uso de estos inhibidores es similar al que se observó en nuestro trabajo con el mutante N67Q en células de mamífero. Además, se reportó que los cuatro serotipos de DENV son inhibidos por la CSP, mientras que la droga casi no tiene efecto sobre la replicación de YFV y WNV (Whitby, Pierson et al. 2005). Considerando el requerimiento de la glicosilación de la Asn 67 observado durante la replicación del DENV en células de mamífero durante la

morfogénesis viral, y sabiendo que el DENV es el único flavivirus que lleva este sitio de glicosilación, el defecto en el procesamiento de este glicano podría ser una explicación para las diferentes susceptibilidades de los inhibidores de CSP y DNJ.

RNAs virales conteniendo la mutación N69Q en la proteína prM fueron diseñados para estudiar la función de la N-glicosilación en esta posición. La transfección de los RNAs N69Q, no produjo partículas infectivas en ninguna de las líneas celulares utilizadas, por lo que fue difícil caracterizar a este mutante. Sin embargo, a través del virus mDV-R pudimos determinar que la mutación N69Q en el sitio potencial de N-glicosilación del DENV, no afecta la traducción viral, ni la replicación del RNA viral (Figura 37). Se observó que los virus con la mutación N69Q de prM, fueron capaces de propagar al ser cotransfectados con RNAs DENV WT. Este resultado está en línea con observaciones previas, en las cuales se determinó que E requiere la co-expresión de prM para adquirir su conformación nativa, sugiriendo un rol de prM como chaperona en el plegado de E (Chambers, Hahn et al. 1990). En otros flavivirus como WNV, TBV y JEV, los cuales también tienen conservado el sitio de glicosilación en prM, se pudieron obtener virus mutantes para este sitio, los cuales en todos los casos afectaron la producción de partículas virales (Goto, Yoshii et al. 2005; Hanna, Pierson et al. 2005; Kim, Yun et al. 2008). Estas observaciones sugieren que la glicosilación de prM tiene un rol importante en la producción viral de los flavivirus. Además, según nuestras observaciones, la glicosilación de prM es esencial para la propagación del DENV.

En resumen, en este capítulo se describió el rol de la N-glicosilación de las proteínas E y prM. Se determinó el rol esencial del glicano 67 en la propagación viral en células de mamífero pero no de mosquito. Además, se comprobó que la N-glicosilación de prM tiene un rol benéfico en la propagación viral en ambos tipos celulares.

Capítulo 3. Identificación de proteínas de la célula hospedadora involucradas en la replicación del virus del dengue

Los virus de RNA poseen genomas de tamaño pequeño, por lo que sólo codifican para unas pocas proteínas. Por lo tanto, deben explotar la maquinaria celular para cada paso de su ciclo de replicación. Así, los virus interactúan con proteínas celulares para facilitar el pegado y la entrada a la célula, para replicar sus genomas, para procesar y transportar las proteínas virales dentro de la célula, para ensamblar los nuevos virus y permitir la salida de la nueva progenie viral. Asimismo, los virus interactúan con proteínas celulares para alterar el ambiente celular, modificando el citoesqueleto y las membranas celulares e inactivando los procesos celulares de defensa; de modo tal de crear un ambiente intracelular más propicio para la replicación viral. Es de esperar que inhibiendo alguno de estos procesos celulares vitales para la replicación viral, se pueda lograr un efecto inhibitorio sobre la producción viral, lo que podría llevar al desarrollo de alguna estrategia antiviral (Coyne and Cherry 2011).

En este capítulo, se emplearon las herramientas genéticas desarrolladas en el Capítulo 1 de esta Tesis, con el fin de identificar y caracterizar nuevos factores celulares implicados en la replicación del DENV. Primeramente, se llevó a cabo la búsqueda de factores celulares implicados en la replicación de DENV haciendo uso de la tecnología del RNA de interferencia (RNAi). En una segunda sección de este Capítulo se estudió la relación de la proteína de cápside del DENV con las organelas celulares *lipid droplets*, caracterizando nuevos factores celulares implicados en esta interacción.

1) **Screen genético mediante RNA de Interferencia**

Introducción

Hasta hace unos años la búsqueda de proteínas celulares implicadas en la replicación viral tenía muchas limitaciones. Las interacciones directas entre las proteínas virales y celulares solo podían ser determinadas por métodos genéticos o bioquímicos, como los ensayos de doble híbrido y de co-inmunoprecipitación. En el año 2001 la tecnología de RNA de interferencia fue descrita por primera vez como una técnica efectiva para disminuir los mRNAs de células de mamíferos y así reducir los niveles proteicos del gen blanco (Elbashir, Harborth et al. 2001). La secuenciación completa de miles de genomas de distintos organismos acompañada de esta tecnología, ha permitido en los últimos años la aparición de diversas bibliotecas de siRNA (*Small interfering RNA*) dirigidas contra todos los transcritos conocidos y predichos de mRNAs en humanos y otros organismos. Así, la búsqueda de proteínas celulares importantes en la replicación de patógenos intracelulares emergió como uno de los primeros usos que se le dio a esta tecnología. De esta forma, ha sido posible la búsqueda de factores celulares implicados en la replicación viral durante una infección real, superando metodológica y conceptualmente la búsqueda de factores en sistemas *in vitro*. La tecnología de RNAi permite, en principio, el estudio de todos los genes celulares que promueven o inhiben la infección viral. Además, tiene un enorme potencial para lograr un mejor conocimiento de las interacciones entre el virus y la célula huésped y para la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.

Resultados

Puesta a punto del virus reportero para formato de gran escala

Con el fin de realizar un *screen* genético de RNAi, se realizó la puesta a punto del virus reportero mDV-R (Capítulo 1) en un formato adecuado para estos estudios. Debido a que las bibliotecas de siRNA están dirigidas contra RNAs humanos, fue necesario evaluar la infección y la sensibilidad del virus reportero en distintas líneas celulares humanas y en un formato adecuado para un ensayo de gran escala.

Se realizaron infecciones en las líneas celulares humanas A549, 293T y HeLa. Las dos primeras mostraron una buena sensibilidad de lectura de la actividad luciferasa en un formato de 24 pocillos, mientras que en células HeLa se observó una baja actividad

luciferasa (resultado no mostrado). Luego, se realizó un ensayo en un formato de 96 pocillos. Se infectaron células 293T y A549. Además, también se infectaron células BHK, las cuales fueron utilizadas como control, ya que el virus reportero había mostrado alta sensibilidad con estas células en este formato. En células 293T y A549 se observaron niveles de actividad luciferasa altos (Figura 30A); sin embargo, se decidió continuar trabajando con estas últimas, porque mostraron una mejor adherencia en cultivo y un crecimiento más uniforme.

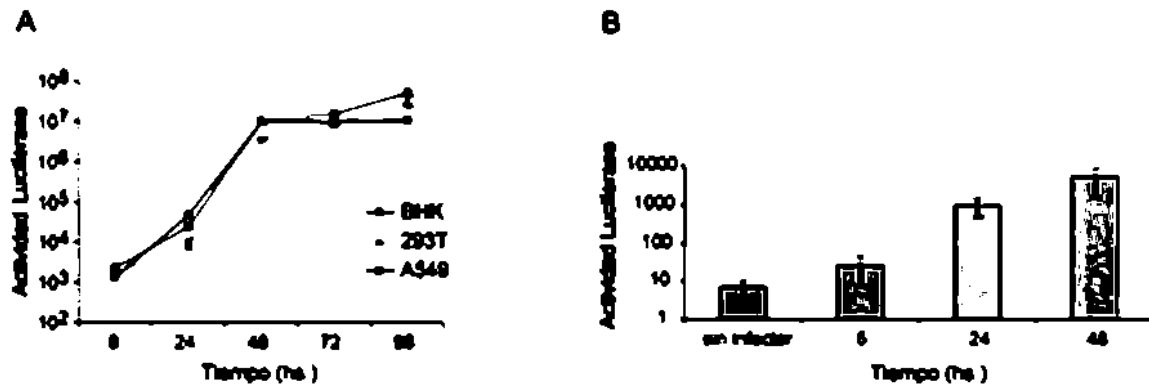


Figura 38. Puesta a punto del virus mDV-R en un formato de gran escala. (A) Células BHK, 293T y A549 crecidas en un formato de 96 pocillos, se infectaron con el virus mDV-R. (B) Células A549 crecidas en un formato de 384 pocillos se infectaron con el virus mDV-R. Se midió la actividad luciferasa en los tiempos post-infección indicados. Los valores representan la media y el error estándar de dos experimentos independientes.

Posteriormente, se evaluó la sensibilidad del ensayo en células A549 en un formato de 384 pocillos. Se observó una alta sensibilidad, detectándose actividad luciferasa desde las 6 horas posteriores a la infección. Además, la actividad luciferasa se incrementó en función del tiempo, ofreciendo un rango dinámico adecuado para realizar el screen (Figura 30B).

Con el propósito de evaluar la respuesta a la interferencia mediada por siRNAs en células A549, se utilizó un siRNA dirigido contra la luciferasa de Renilla (siRLuc) codificada por el virus reportero. Además, se utilizaron siRNAs sin un blanco celular, como control negativo de la interferencia (siNT). Así, células transfectadas con los siRLuc o siNT fueron infectadas con distintas diluciones de un stock de mDV-R. Se observó una disminución de la actividad luciferasa en aquellas células transfectadas con los siRLuc respecto de las células control. Además, la actividad fue dependiente de la cantidad de stock viral utilizada (Figura 39A). Estos resultados confirmaron que el mDV-R tiene sensibilidad suficiente para ser utilizado en un formato de 384 pocillos, que el siRLuc es un control positivo adecuado para realizar el screen, y que las células A549 tienen una buena respuesta a la interferencia.

Seguidamente, se realizó la puesta a punto de la cantidad de células por pocillo. Células A549 fueron transfectadas con los siRNAs control y luego infectadas con el mDV-R. La mejor diferencia de actividad entre células transfectadas con siRLuc y siNT, se encontró en aquellos pocillos con 1500 células (Figura 39B), por lo que se utilizó esta cantidad de células en los experimentos posteriores.

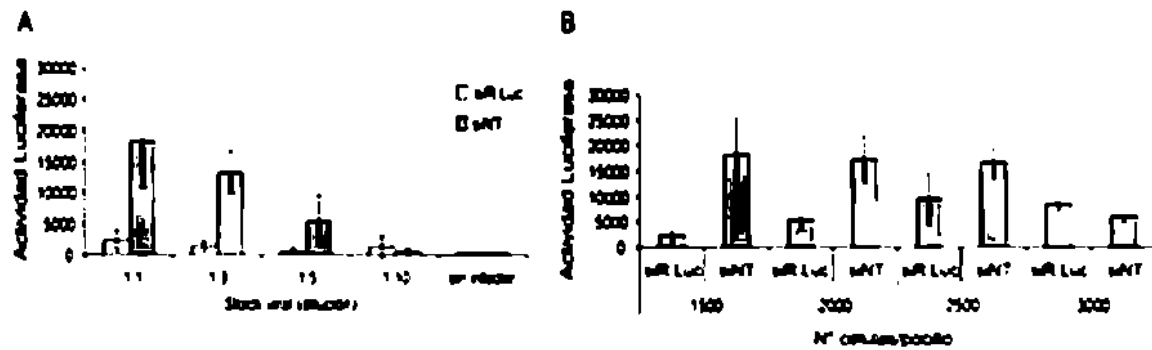


Figura 39. Puesta a punto del ensayo de RNAi en un formato de gran escala. Células A549 crecidas en un formato de 384 pocillos, fueron interferidas con siRNAs dirigidos contra la luciferasa de Renilla (siRLuc) o contra una secuencia no relacionada (siNT). Las células fueron infectadas con el virus mDV-R y utilizadas para el ensayo de actividad a las 48 hs post-infección. (A) Las células fueron infectadas con distintas diluciones de un stock viral de mDV-R. (B) Distintas cantidades de células por pocillo fueron utilizadas para realizar el ensayo de RNAi.

Screen primario

A través de la puesta a punto, el ensayo de Interferencia fue miniaturizado para ser utilizado en un formato de 384 pocillos, determinándose los parámetros óptimos con los siRLuc y siNT. Se estableció un protocolo en el cual 1500 células A549 por pocillo fueron infectadas 48 horas después de transfectar los siRNAs. La actividad luciferasa se midió 48 horas después de la infección (durante la fase replicativa del mDV-R).

Para la realización del *screen* se estableció una colaboración con el *Genomic Institute of Novartis Reserch Foundation (GNF)*, ya que este instituto cuenta con las bibliotecas de siRNAs y con la automatización necesaria para el desarrollo de los ensayos.

Se decidió realizar un *screen* genético mediante RNAi, utilizándose bibliotecas de siRNAs dirigidas contra los mRNAs de todas las quinasas codificadas por el genoma humano (quinoma). La decisión de buscar quinasas de la célula huésped involucradas en el ciclo de replicación del virus se debió a que las quinasas son proteínas fundamentales para las vías de señalización celular, por lo que era esperable que el virus las utilice durante la replicación. Además, muchas vías de señalización de quinasas han sido profundamente estudiadas, por lo que es relativamente sencillo contar con herramientas genéticas e inhibidores para facilitar la validación de los genes candidatos.

Fueron utilizadas dos bibliotecas comerciales de siRNAs; una de Invitrogen y otra de IDT. La biblioteca de Invitrogen estaba dirigida contra 645 quinasas distintas, con un total de 2 siRNAs distintos/gen. La biblioteca de IDT, estaba dirigida contra 543 quinasas distintas, con 4 siRNAs distintos/gen. De esta forma, aproximadamente un total de 6 siRNAs fueron dirigidos contra cada gen. Las bibliotecas contaban con diferentes siRNAs pre-sembrados en cada pocillo de las placas de 384 pocillos. Los controles (siR.Luc y siNT) fueron sembrados en cada placa en posiciones predefinidas. Estos pasos, y todos los posteriores en la realización del *screen*, fueron realizados usando la automatización robótica disponible en GNF. De esta forma se aseguró la robustez y reproducibilidad de los datos obtenidos. Los resultados de cada biblioteca de siRNAs fueron analizados usando un programa diseñado específicamente por GNF, para asegurar el control de calidad de los datos y predecir estadísticamente resultados significativos.

Luego de la realización del *screen* todos los datos fueron representados en un *heat map*, el cual mostraba la actividad de cada siRNA dentro de la placa de 384 pocillos. Luego, se calculó el promedio de la inducción/represión para todos los pocillos y se normalizaron los datos de cada pocillo por la media de cada placa. La validación interna del *screen* fue evaluada observando la actividad luciferasa obtenida en células tratadas con los siR.Luc (control positivo) y si.NT (control negativo). La actividad obtenida en células tratadas con los siR.Luc tuvo una diferencia de más de tres desvíos estándar de la media, mientras que los controles negativos se encontraron en un rango de un desvío estándar de la media. Estos valores indican una adecuada separación de los controles. (Figura 40). Además, los datos experimentales presentaron una distribución normal esperada.

Los resultados obtenidos con las bibliotecas de IDT e Invitrogen, fueron combinados y filtrados por citotoxicidad. De esta forma, se obtuvieron las quinasas celulares putativas involucradas en la replicación del virus con aproximadamente 6 siRNAs distintos por gen. Como criterio de análisis se tomaron aquellos genes que mostraron una inhibición de la replicación del DENV de más de un 85%, con por lo menos dos siRNAs distintos. Así, se obtuvieron 80 posibles candidatos de quinasas involucradas en la replicación del virus.

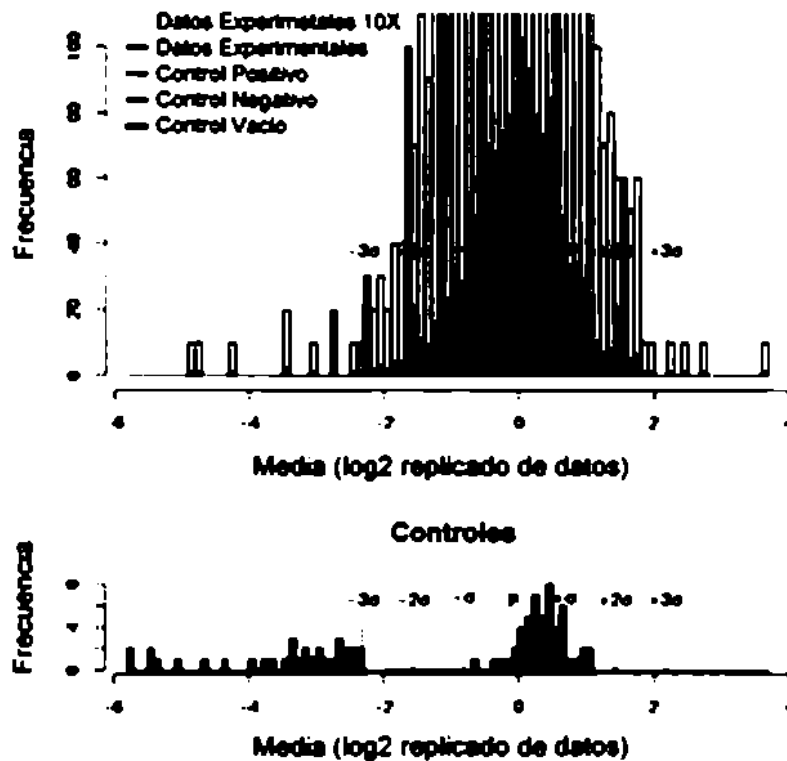


Figura 41. Histograma de datos obtenidos del *screen* primario. El eje X representa la media de la intensidad de los replicados transformados por \log_2 . El eje Y mide la frecuencia de las medias en el rango indicado. Los valores de los datos experimentales son mostrados en el panel superior. Los valores de los controles son mostrados en el panel inferior. Color rojo: siRLuc (control positivo); color verde: siNT (control negativo); color negro: sin siRNA. Los desvíos estándar son mostrados en ambos paneles.

Screen Secundario

Para la validación de los resultados del *screen* se tomaron 16 candidatos de los seleccionados en el *screen* primario (Figura 41). Como criterios de selección se tuvo en cuenta la cantidad de siRNAs que habían mostrado inhibición en el *screen* primario y el valor de inhibición de la actividad luciferasa observado.

La validación se realizó en un formato de 96 pocillos, y se utilizaron 2 siRNAs de Invitrogen y de 1 a 3 siRNAs de IDT. Se emplearon las líneas celulares A549, HepG2 y HeLa. Además, se evaluó nuevamente la citotoxicidad de los siRNAs, utilizándose el kit comercial *Cell Titer Glo*. De este *screen* secundario, solo se seleccionaron aquellos candidatos que mostraron inhibición con las tres líneas celulares testeadas, con por lo menos 2 siRNA/gen, y sin mostrar citotoxicidad (Figura 42).

| Símbolo | Nombre |
|----------|---|
| SLK | STE20-like kinase 9 |
| PHKG1 | phosphorylase kinase, gamma 1 |
| CDC42BPA | CDC42 binding protein kinase alpha (DBPK-like) |
| IRAK2 | interleukin-1 receptor-associated kinase 2 |
| IRAK3 | interleukin-1 receptor-associated kinase 3 |
| EPHB2 | EPH receptor B2 |
| HCK | hemopoietic cell kinase |
| MAP4K5 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5 |
| OXR1 | oxidative stress responsive 1 |
| FLJ25008 | hypothetical protein FLJ25008 |
| ROCK1 | Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 |
| TTK | TTK protein kinase |
| MAP3K3 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 |
| EPHA10 | EPH receptor A10 |
| EIF2AK2 | eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2 |
| ERN1 | endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 |

Figura 41. Quinasas candidatas obtenidas en el screen primario. La tabla muestra las quinasas que mostraron una mayor inhibición de la replicación del DENV al ser interferidas con siRNAs.

| | Inhibición (%) | | |
|----------|----------------|---------|---------|
| | A549 | HepG2 | HeLa |
| EPHB2 | 72 ± 2 | 70 ± 13 | 79 ± 13 |
| HCK | 71 ± 7 | 42 ± 29 | 48 ± 30 |
| EIF2AK2 | 66 ± 2 | 77 ± 3 | 85 ± 2 |
| CDC42BPA | 70 ± 3 | 68 ± 1 | 94 ± 1 |
| OXR1 | 68 ± 31 | 68 ± 1 | 98 ± 1 |
| MAP4K5 | 49 ± 8 | 70 ± 13 | 79 ± 1 |
| ROCK1 | 62 ± 6 | 62 ± 13 | 96 ± 1 |
| TTK | 70 ± 1 | 78 ± 14 | 70 ± 16 |
| IRAK2 | 70 ± 15 | 65 ± 17 | 68 ± 12 |
| MAP3K3 | 43 ± 16 | 76 ± 14 | 61 ± 26 |
| FLJ25008 | 83 ± 6 | 65 ± 35 | 71 ± 6 |
| IRAK3 | 72 ± 2 | 71 ± 7 | 70 ± 13 |
| ERN1 | 49 ± 13 | 70 ± 12 | 72 ± 1 |

Figura 42. Quinasas candidatas obtenidas en el screen secundario. La tabla indica el % de inhibición de la actividad luciferasa medida en células infectadas con el mDV-R, luego de la interferencia de las quinasas indicadas. El ensayo fue realizado por triplicado en las líneas celulares A549, HepG2 y HeLa. Los valores indican la media de cada experimento y ± indica el error estándar.

Los candidatos obtenidos en este screen secundario fueron testeados utilizándose el virus WT, evaluándose la inhibición a través de ensayos de placa de lisis (Figura 43). Se observó una disminución del título viral con todos los siRNAs testeados. La mayor inhibición se logró luego de la interferencia de las quinasas EPHB2, CDC42BPA y MAP4K5, con una disminución en el título viral de más de 1000 veces.

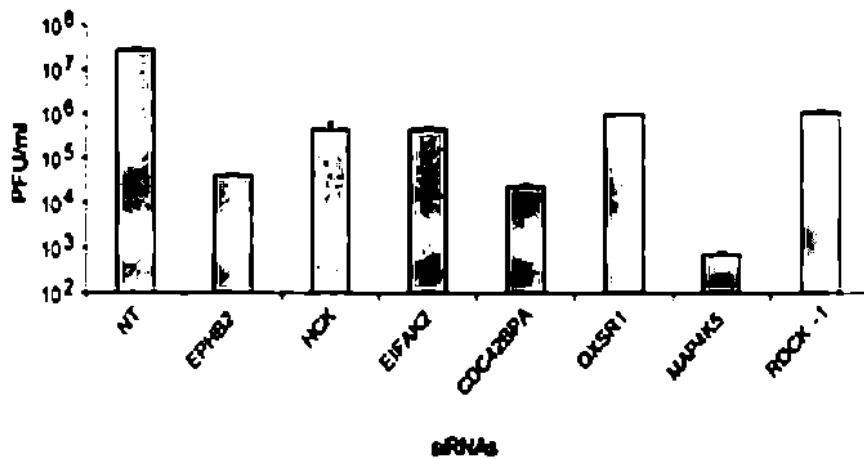


Figura 43. Producción de partículas virales de DENV WT en células interferidas para las quinasas candidatas. Células A549 interferidas con siRNAs para las quinasas indicadas fueron infectadas con DENV WT (MOI = 0.1). Los sobrenadantes fueron cosechados 48 hs luego de la infección y titulados a través de un ensayo de placa de lisas en células BHK.

Se decidió seguir estudiando con mayor profundidad a estas últimas quinasas, cuya disminución tuvo efectos más importantes en la producción de partículas virales. Para esto, se analizó por PCR en tiempo real la disminución de los niveles de mRNAs de estas quinasas luego de la transfección con los siRNAs específicos. Se observó una disminución de entre un 50 y un 90 % en las expresiones de los mRNAs luego del tratamiento (Figura 44). Estos resultados muestran que la interferencia es eficiente para cada gen analizado.

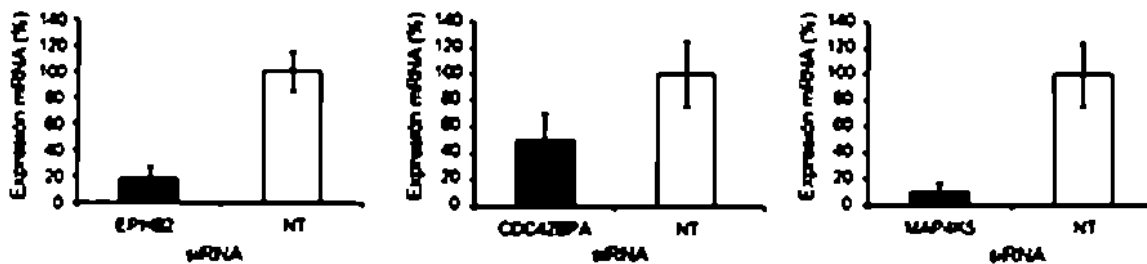


Figura 44. Cuantificación de los niveles de los mRNAs luego de la interferencia por siRNAs. Se realizó la cuantificación del mRNA de células A549 interferidas para las quinasas EPHB2, CDC42BP1 y MAP4K5 mediante RT-PCR en tiempo real. Se utilizaron oligos específicos para cada quinasa. Los valores de expresión representan las medias de dos experimentos independientes normalizados por la expresión del mRNA del gen de la beta actina.

Implicancia de las quinasas EPHB2, CDC42BP1 y MAP4K5 en las distintas etapas del ciclo de replicación del virus

Se utilizó el virus reportero mdV-R para determinar en qué etapa del ciclo celular estaban implicadas las quinasas de nuestro screen. Para esto se infectaron células interferidas para EPHB2, CDC42BP1 y MAP4K5 y se midió la actividad luciférasa en función del tiempo. A

las 8 hpi, período de tiempo que refleja la traducción del RNA viral, se observó una disminución de la actividad luciferasa para las tres quinasas (Figura 45A). Este resultado puede significar que la falta de las quinasas puede tener un efecto en la entrada del virus o en la traducción del RNA. Para determinar esto, se evitó el paso de entrada del virus transfectando directamente el RNA del mDV-R en las células. Al medir la actividad luciferasa luego de 8 hpt no se observaron diferencias respecto el control (Figura 45A). Esto sugiere que las quinasas están implicadas en la entrada del virus a la célula, pero no en la traducción del RNA viral.

Para determinar si las quinasas estaban implicadas en la replicación del RNA viral, se midió la actividad luciferasa en células transfectadas con RNA mDV-R a las 24 hpt, de forma tal de sortear el paso de entrada del virus, y medir sólo la actividad que refleja la replicación viral. Se observó una disminución de la actividad para las quinasas EPHB2 y MAP4K5, pero no para CDC42BPA (Figura 45B). Como era de esperar, la actividad luego de la infección disminuyó por la interferencia de todas las quinasas.

Estos resultados en su conjunto, demuestran que las quinasas EPHB2 y MAP4K5 están implicadas en la entrada y la replicación del RNA viral. Por otro lado, la proteína CDC42BPA, sólo estaría involucrada en procesos relacionados con la entrada del virus a la célula.

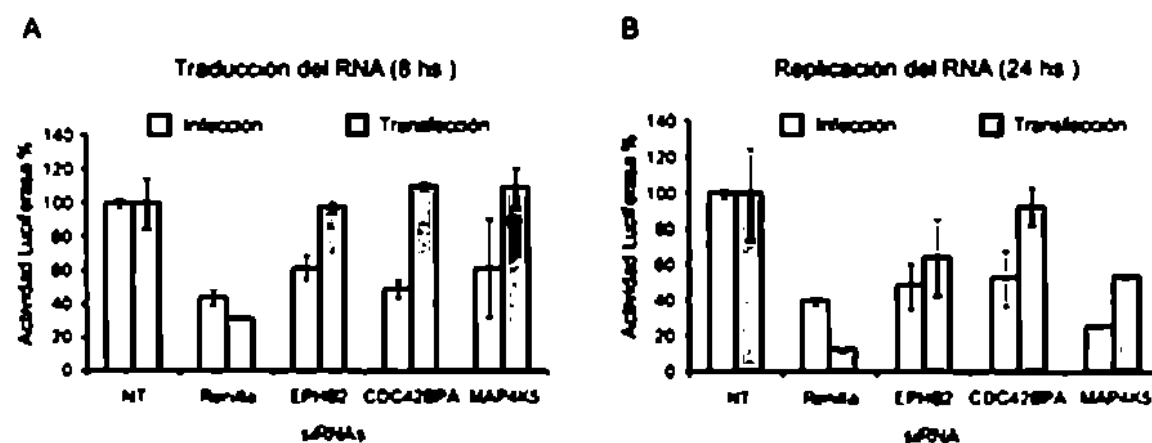


Figura 45. Utilización del virus mDV-R para estudiar la implicancia de las quinasas en el ciclo de vida del virus. Células AS49 interferidas para las quinasas indicadas, fueron transfecadas con RNAs de mDV-R o infectadas con un stock de mDV-R (A) Medición de la actividad luciferasa de los extractos celulares a las 8 hs luego de la infección o transfección (B) Medición de la actividad luciferasa de los extractos celulares a las 24 hs luego de la infección o transfección

Validación de las quinasas candidatas utilizando otras metodologías

CDC42BPA/MRCK

La quinasas CDC42BPA/MRCK, es la quinasas efectora de CDC42. Esta última, pertenece a la familia de las GTPasas de Rho, junto con las proteínas Rac y Rho, las cuales están involucradas en la movilidad y proliferación celular y la apoptosis. Además, están implicadas en la formación y en la dinámica del citoesqueleto de actina y la red de microtúbulos (Riento and Ridley 2003).

Interesantemente, ha sido propuesto que algunos virus modifican el citoesqueleto de actina y los microtúbulos de la célula hospedadora con el fin de facilitar la entrada de las partículas virales (Radtke, Dohner et al. 2006). Esta observación es muy pertinente, dado que se observó que la quinasas CDC42BPA tiene un efecto en la entrada del virus a la célula. Basados en esto, se buscaron nuevamente entre las quinasas candidatas del *screen* primario aquellas involucradas en la movilidad celular y la dinámica del citoesqueleto. Se encontraron en esta lista a las quinasas, CDC42BPB (CDC42 binding protein kinase beta), MYLK2/ MLCK (Myosin light chain kinase 2) y ROCK 1 (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1). Muy sugestivamente, tanto las quinasas ROCK 1, CDC42BPA/MRCK y MLCK fosforilan a la proteína MLC (myosin light chain), la cual a su vez posibilita la formación de fibras de estrés y la contracción celular (Figura 46).

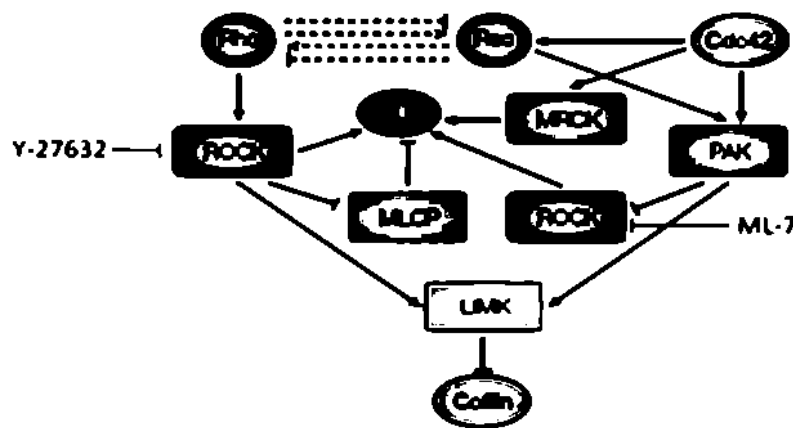


Figura 46. Vías implicadas en la dinámica de la actina/miosina. Se muestran los compuestos inhibidores de ROCK 1 (Y-27632) y MLCK (ML-7). Modificado de (Riento and Ridley 2003).

De las quinasas mencionadas, existen inhibidores comerciales para ROCK 1 y para MLCK, siendo estos los compuestos Y-27632 y ML-7 respectivamente. Se evaluó la actividad antiviral de estos compuestos utilizando el virus reportero mDV-R. El inhibidor de la quinasas ROCK, Y-27632, no disminuyó la actividad luciférasa en nuestro ensayo en

ninguna de las condiciones testeadas (Figura 47A). Este resultado fue inesperado, debido a que la disminución de los niveles de mRNA de esta quinasa redujo la replicación viral, inclusive en el *screen* secundario llevado a cabo con distintas líneas celulares (Figura 42). Además, la transfección de células con siRNAs dirigidos contra ROCK, disminuyó drásticamente los niveles de la proteína (Figura 47B).

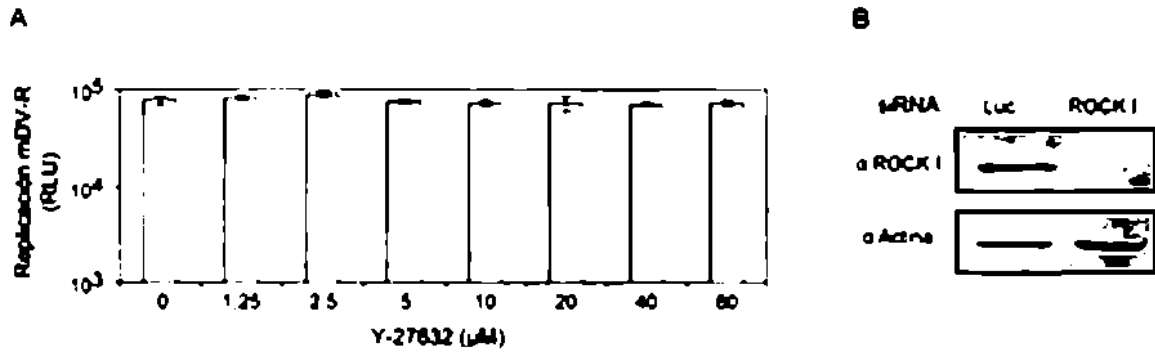


Figura 47. Efecto del compuesto Y-27632 sobre la replicación del DENV. (A) Células A549 fueron tratadas con las concentraciones de Y-27632 indicadas e infectadas con el virus mDV-R. Se realizó la medición de la actividad luciferasa a las 48 hs post-infección. (B) WB con anticuerpos anti ROCK 1 realizado a partir de extractos de células A549 tratadas con siRNAs dirigidos contra ROCK 1.

Al utilizar el compuesto ML-7, inhibidor de la MLCK, se observó una inhibición de más de 5 veces en la actividad luciferasa respecto al control, en condiciones no tóxicas para la célula (Figura 48A). En ensayos utilizando el virus WT se midió una disminución de hasta 100 veces en el título viral en células tratadas con el inhibidor (Figura 48B).

Estos resultados en su conjunto sugieren que la contracción celular y la formación de fibras de estrés vía la proteína MLC, juegan un rol importante en la replicación del virus; y que la manipulación de la vía afecta drásticamente la producción viral.

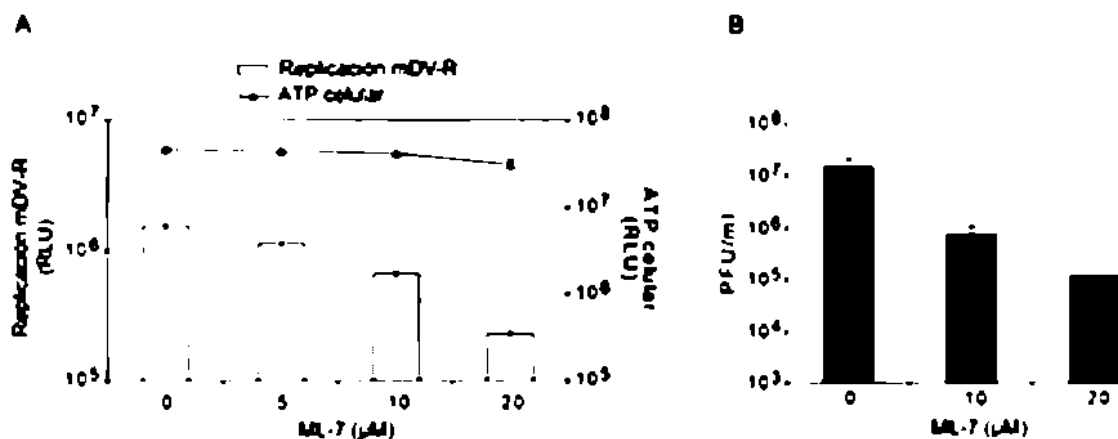


Figura 48. Efecto de la inhibición farmacológica de MLCK sobre la replicación del DENV. (A) Células A549 se trataron con el compuesto ML-7 y se infectaron con el virus mDV-R. Se midió la actividad luciferasa a las 48 hs post-infección. En paralelo se tituló el ATP celular utilizando el kit comercial Cell Titer Glo. (B) Células A549

tratadas con el compuesto ML-7 se infectaron con el virus DENV WT (MOI=0.1). A las 48 hs post-infección se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por ensayo de placa de lisas.

EPHB2

La quinasa EphB2 pertenece a la familia Eph de tirosina quinasa receptoras. Es una quinasa de membrana que se activa por ligandos unidos a membrana llamados epirinas. La unión del ligando epirina B a los receptores EphB en la superficie de las células inicia cascadas de señalización intracelular a través de la fosforilación de otras proteínas. EphB2 está involucrada en cambios de la matriz celular, en la adhesión célula-célula, en la organización de citoesqueleto y en la activación de la vía de MAPK (Pasquale 2005). Además, ha sido descrito que la vía de efrina B-EphB regula la endocitosis mediada por clatrina (Irie, Okuno et al. 2005). Interesantemente, en la lista de las quinazas candidatas del screen primario, también se encontró a EphB3, una isoforma de la familia EphB.

Ha sido reportado que el dominio citosólico de las quinazas EphB interacciona con proteínas con dominio Src (Pasquale 2005). Sugestivamente, al analizar todas la quinazas cuya disminución afectó negativamente la replicación del virus, se observó un enriquecimiento significativo ($p=0.03$) de quinazas con dominio Src (Figura 49). Esto sugiere que la quinazas miembros de la familia EphB podrían actuar en la replicación de virus a través de las quinazas con dominio Src.

| Gene Symbol | Gene Name |
|-------------|--|
| OBSCN | osteoblast protein 14kDa |
| MAP3K10 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10 |
| TAK1 | tubulin-associated kinase 1 |
| LCK | lymphocyte-specific protein tyrosine kinase |
| FRK | Fes-related kinase |
| HCK | hemopoietic cell kinase |
| PTA1004 | protein tyrosine kinase 4 |
| ABL2 | v-abl oncogene protein kinase with src-like structure homolog 2 (src, abelson, related gene) |

Figura 49. Grupo de quinazas candidatas del screen primario con dominio Src ($p=0.03$). Fuente: Functional Annotation Tool DAVID Bioinformatics Resources 6.7.

MAP4K5/GCKR/KHS

La quinasa MAP4K5/GCKR/KHS es un potente y selectivo activador de la vía SAPK/JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). Además, se reportó que MAP4K5 está relacionada en la activación de la vía de JNK mediada por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) (Kyriakis 1999). La vía de JNK, es activada en respuesta a estímulos de estrés celular, como radiación

ultravioleta y estrés osmótico o de temperatura. Además, está involucrada en los procesos de apoptosis y de respuesta inflamatoria.

Con el fin de validar mediante otra metodología la importancia de MAP4K5 en la replicación de virus, se silenció la expresión de MAP4K5 utilizando un shRNA (*short-harpin RNA*) dirigido contra MAP4K5, clonado en el vector pSIREN-RetroQ. Como RNA control se utilizó un shRNA dirigido contra el gen de la luciferasa de Firefly, clonado en el mismo vector. Se transfectaron células A549 con estos plásmidos y se generaron las líneas estables A549.shGCKR y A549.shLuc. Al analizar los niveles de MAP4K5/GCKR en estas líneas celulares, se determinó una disminución casi total de éstos en las células transfectadas con la construcción shGCKR (Figura 50A). Se infectaron estas líneas celulares con el virus DENV WT, y luego se tituló el sobrenadante de 48 hpi con el fin de cuantificar la carga viral. Se observó una disminución de más de 100 veces en el título viral (Figura 50B).

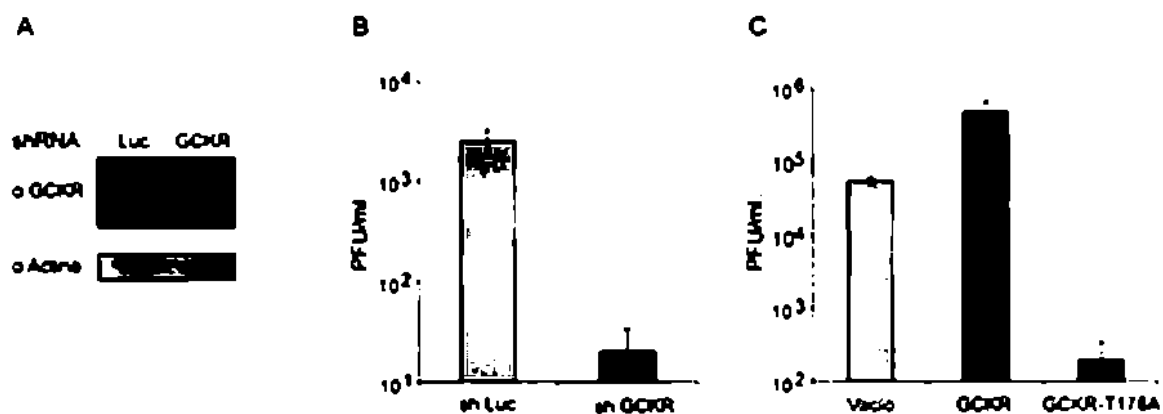


Figura 50. Implicancia de la quinasa MAP4K5/GCKR en la replicación del DENV. (A) WB de MAP4K5/GCKR realizados a partir de lisados de células A549 transfectadas con los shRNAs dirigidos contra GCKR y Luc. (B) Células A549 transfectadas con los shRNAs dirigidos contra GCKR y Luc. fueron infectadas con el virus DENV WT (MOI=0.1). Los sobrenadantes fueron cosechados 48 hs. luego de la infección y titulados en células BHK. (C) Células A549 transfectadas con los plásmidos pCR3-GCKR WT, pCR3-GCKR-T178A y pCR3 (vacío) fueron infectadas con el virus DENV WT (MOI=0.1). Los sobrenadantes fueron cosechados 48 hs. luego de la infección y titulados en células BHK.

Con el fin de determinar si la activación de la vía de MAP4K5/GCKR tenía un efecto positivo en la replicación de virus, se generaron líneas estables con el plásmido pCR3-GCKR, el cual sobre-expresa la versión WT de la quinasa. Además, se obtuvieron las líneas estables con una versión mutante sin actividad quinasa y con efecto dominante negativo (GCKR-T178A). Se infectaron estas nuevas líneas celulares con el virus DENV WT y se tituló el sobrenadante de 48 hpi. Se cuantificó un aumento de 10 veces en el título viral de aquellas células transfectadas con la construcción GCKR WT (Figura 50C). En aquellas

células transfectadas con la construcción GCKR-T178A se observó una dramática caída en la producción de partículas infectivas de más de 100 veces.

Estos resultados confirman la importancia de MAP4K5 en la replicación viral, además muestran que la activación de la vía mediante la sobre-expresión de MAP4K5 tiene un efecto positivo sobre la producción de partículas virales.

Debido a que MAP4K5 se relaciona con la actividad de la vía JNK, se estudió si esta quinasa *per se* tenía un rol sobre la replicación del DENV. Para esto se utilizó un potente y selectivo inhibidor de JNK llamado SP600125. El tratamiento con éste redujo la actividad luciferasa del mDV-R hasta 10 veces, con una inhibición de la replicación del virus dosis dependiente (Figura 51A). Además, se observó una inhibición similar en la producción de partículas virales en células tratadas e infectadas con el virus WT (Figura 51B). Este resultado muestra que la quinasa JNK tiene un efecto sobre la producción viral, confirmando la implicancia de esta vía en la replicación del virus. Además, el efecto inhibitorio del compuesto SP600125 muestra que es posible disminuir la producción viral perturbando la vía de MAP4K5/JNK.

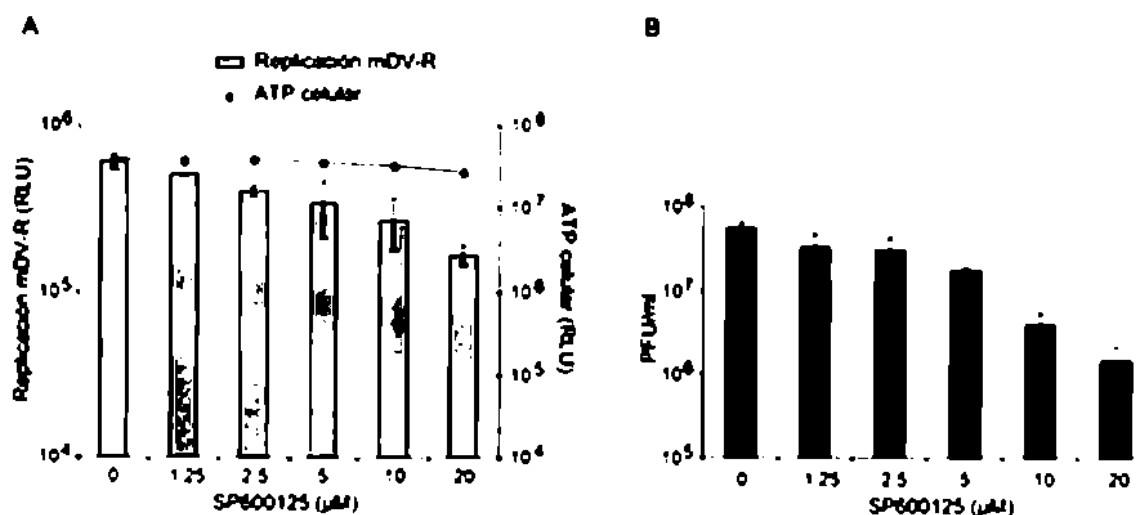


Figura 51. Efecto del compuesto SP600125 sobre la replicación del DENV. Células A549 tratadas con las concentraciones de SP600125 indicadas fueron infectadas con los virus mDV-R o DENV WT. (A) Las células fueron infectadas con el virus mDV-R y la actividad luciferasa se midió a las 48 hs post-infección. En paralelo se tituló el ATP celular utilizando el kit comercial Cell Titer Glo. (B) Las células fueron infectadas con el virus DENV WT (MOI=0.1). Los sobrenatantes fueron cosechados y titulados a las 48 hs post-infección.

2) Interacción del virus del dengue con los *lipid droplets*

Introducción

Recientemente en nuestro laboratorio se determinó que la proteína de cápside (C) del virus del dengue se localiza en la superficie de organelas celulares llamadas *lipid droplets* (LDs). A través de ensayos de mutagénesis usando clones infecciosos de dengue, se determinó que los aminoácidos hidrofóbicos L50 y L54 de la proteína C son esenciales para su localización en LDs y la producción de partículas virales. Además, se observó que la infección del DENV aumentó el número de LDs por célula, sugiriendo que puede existir un vínculo entre el metabolismo de los LDs y la replicación viral (Samsa, Mondotte et al. 2009). Por este motivo y con fin de estudiar la función de los LDs durante la replicación del DENV se investigó la relación entre la proteína C y los factores celulares presentes en LDs.

Los LDs son organelas citoplasmáticas cuya función principal es el almacenamiento de lípidos. Están compuestos en su interior por lípidos neutros, como los triacilgliceroles (TAG) y ésteres de esteroles, los cuales están rodeados por una monocapa de fosfolípidos cubierta por proteínas específicas (Tsuchi-Sato, Ozeki et al. 2002).

Estudios proteómicos han identificado proteínas asociadas a LDs que están involucradas en el metabolismo de lípidos, tráfico intracelular, vías de señales, metabolismo del RNA y organización del citoesqueleto (Bickel, Tansey et al. 2009). Las proteínas asociadas a LDs pueden variar por las condiciones metabólicas de la célula y dentro de distintos tipos celulares.

Dentro del grupo de proteínas que se encuentran en LDs se destacan los miembros de la familia PAT, los cuales comparten similitud de secuencia y su capacidad para unirse a los LDs. El término PAT se origina en el nombre de los primeros tres miembros de esta familia en ser descubiertos: perilipina, ADRP (adipocyte differentiation-related proteina) y TIP47 (tail-interacting protein of 47 KDa).

La proteína perilipina es expresada sólo en adipocitos y células esteroideogénicas (Londos, Brasaemle et al. 1995). En condiciones basales perilipina se encuentra cubriendo los LDs, actuando como barrera e impidiendo que las lipasas ingresen al interior de los LDs, evitando la hidrólisis de los triglicéridos. Por el contrario, bajo estimulación hormonal, las proteínas perilipina y HSL (hormone-sensitive lipase) son fosforiladas por acción de la

PKA (protein kinase A) facilitando de esta manera la lipólisis. De hecho, adipocitos aislados de ratones *knock out* para perilipina, mostraron una elevada tasa basal de lipólisis (Bickel, Tansey et al. 2009). Ha sido reportado que tanto perilipina como ADRP que no se encuentran unidas a LDs son degradados por la vía de ubiquitin-proteasoma. (Xu, Sztalryd et al. 2005). Por lo tanto, ambas proteínas se encuentran unidas a LDs constitutivamente.

En contraste con perilipina, ADRP es expresada de manera ubicua en muchos tejidos (Brasaemle, Barber et al. 1997; Heid, Moll et al. 1998; Xu, Sztalryd et al. 2005). ADRP, al igual que perilipina, actúa limitando la interacción de lipasas citosólicas con los lípidos neutros que se encuentran dentro de los LDs, promoviendo de esta manera la acumulación de lípidos. La sobre-expresión de ADRP ha sido asociada con el aumento en el número de LDs y un incremento en la cantidad de TAG (Imamura, Inoguchi et al. 2002). Fue demostrado que ADRP reduce la hidrólisis de TAG evitando la localización en LDs de la lipasa ATGL (adipose triglyceride lipase) (Listenberger, Ostermeyer-Fay et al. 2007). Además, la pérdida de función de ADRP ha sido asociada con una disminución en el número y tamaño de LDs, una menor expresión de genes lipogénicos, y un incremento en la oxidación beta de los ácidos grasos (Bickel, Tansey et al. 2009). Debido a estas observaciones ha sido propuesto que ADRP tiene un rol en la formación de los LDs. De todas maneras, los efectos de la falta de ADRP reportados resultan muchas veces contradictorios, probablemente debido a que el rol de ADRP depende del tipo celular estudiado.

La proteína TIP47, al contrario que perilipina y ADRP, es estable en el citosol de las células y se mueve a la superficie de los LDs en respuesta a un aumento en la cantidad de lípidos (Wolins, Rubin et al. 2001).

Recientemente, se publicó que componentes de sistema de transporte de vesículas COPI (Coat Protein Complex I) que median el transporte retrógrado desde el Golgi al ER están involucrados en el transporte de proteínas a los LDs, y en su funcionamiento. (Beller, Sztalryd et al. 2008; Soni, Mardones et al. 2009). Las vesículas de COPI consisten en un heptámero de proteínas que es ensamblado en el Golgi. El ensamblado es iniciado por la actividad de la proteína de unión a GDP/GTP, ARF1 (ADP-ribosylation factor 1). A su vez, el estado de unión a GDP/GTP es regulado por la GEF (guanine-nucleotide exchange factor) de ARF. Se observó que la perturbación en el sistema COPI llevó a un aumento en el almacenamiento de lípidos y una disminución en la tasa de lipólisis, que correlacionaron con una disminución en la localización de la lipasa ATGL en la superficie de los LDs (Beller, Sztalryd et al. 2008). Además, la localización de ADRP en LDs demostró ser dependiente

de COPI, pero no así la localización de TIP47 (Soni, Mardones et al. 2009). Refuerzan la hipótesis de un rol de COPI en la función de los LDs, la observación de que componentes de la maquinaria de COPI han sido encontrados en fracciones purificadas de LDs. Además, ADRP interacciona con ARF1, y la expresión del mutante dominante de ARF1 resulta en la disociación de ADRP de los LDs (Nakamura, Akashi et al. 2004).

En base a estos descubrimientos y observaciones realizadas con tomografía electrónica, ha sido propuesto que COPI puede mediar el transporte de proteínas desde los sitios de salida del ER, ERES (*ER exit sites*) o desde los compartimentos intermedios del ER-Golgi, ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*). Estos estudios muestran que los ERES y ERGIC se encuentran cercanos a los LDs, revelando la posibilidad que el tráfico de COPI pueda darse desde o hacia los LDs (Soni, Mardones et al. 2009).

Estudios con el virus de la hepatitis C (HCV) han demostrado que la proteína *core* se dirige a los LDs durante la infección. Además, las mutaciones que impiden que la proteína de *core* se localice en LDs disminuyen la producción de partículas virales (Boulant, Targett-Adams et al. 2007). La proteína *core* de HCV produce cambios en la distribución intracelular de los LDs, posicionándose éstos alrededor del núcleo. Aparentemente, la distribución de los LDs es llevada a cabo a través de un proceso que involucra el desplazamiento de ADRP por la proteína *core* en los LDs. Esta habilidad de la proteína *core* para modificar la distribución de los LDs parece ser importante para la producción viral, ya que si se altera la red de microtúbulos, se produce una disminución de la misma (Boulant, Douglas et al. 2008).

Resultados

La proteína ADRP es desplazada de los LDs durante la infección viral.

Con el fin de establecer si la localización de la proteína C en los LDs tenía algún efecto sobre éstos, se estudió si C afectaba a proteínas de la célula huésped presentes en LDs. El estudio se focalizó en la proteína ADRP, debido a que ésta es expresada en una gran variedad de tipos celulares (Heid, Moll et al. 1998) y se encuentra constitutivamente unida a LDs (Wolins, Brasaemle et al. 2006).

Células BHK fueron infectadas con DENV y se analizaron los niveles de C y ADRP a través de ensayos de IF y WB. Como era de esperar, se observó un aumento de C en LDs en células infectadas. Sorpresivamente, en estas células disminuyó la marca de ADRP en LDs, desapareciendo casi totalmente a las 24 hpi (Figura 52A). Con el fin de analizar los niveles

de ADRP se realizaron ensayos de WB. Estos resultados también indicaron que los niveles de ADRP disminuyen en células infectadas (Figura 52B).

Para estudiar el efecto de la infección viral sobre la localización de ADRP, se determinaron los coeficientes de colocación de Pearson entre ADRP y LDs, y entre C y LDs. Para esto se tomaron fotografías de células infectadas y control a las 4, 8 y 24 hpi. Como se observa en la Figura 52C, los valores de colocación de ADRP/LDs no variaron significativamente en células sin infectar. Por lo contrario, en células infectadas se observó una disminución de la colocación de ADRP en LDs a partir de las 8 hpi, acentuándose el efecto a las 24 hpi. Como era de esperar, el coeficiente de colocación de C/LDs, aumento conforme transcurrió la infección (Figura 52C).

En conjunto, estos resultados demuestran que la proteína ADRP es desplazada de los LDs, conforme progresa la infección viral y C se acumula en los LDs.

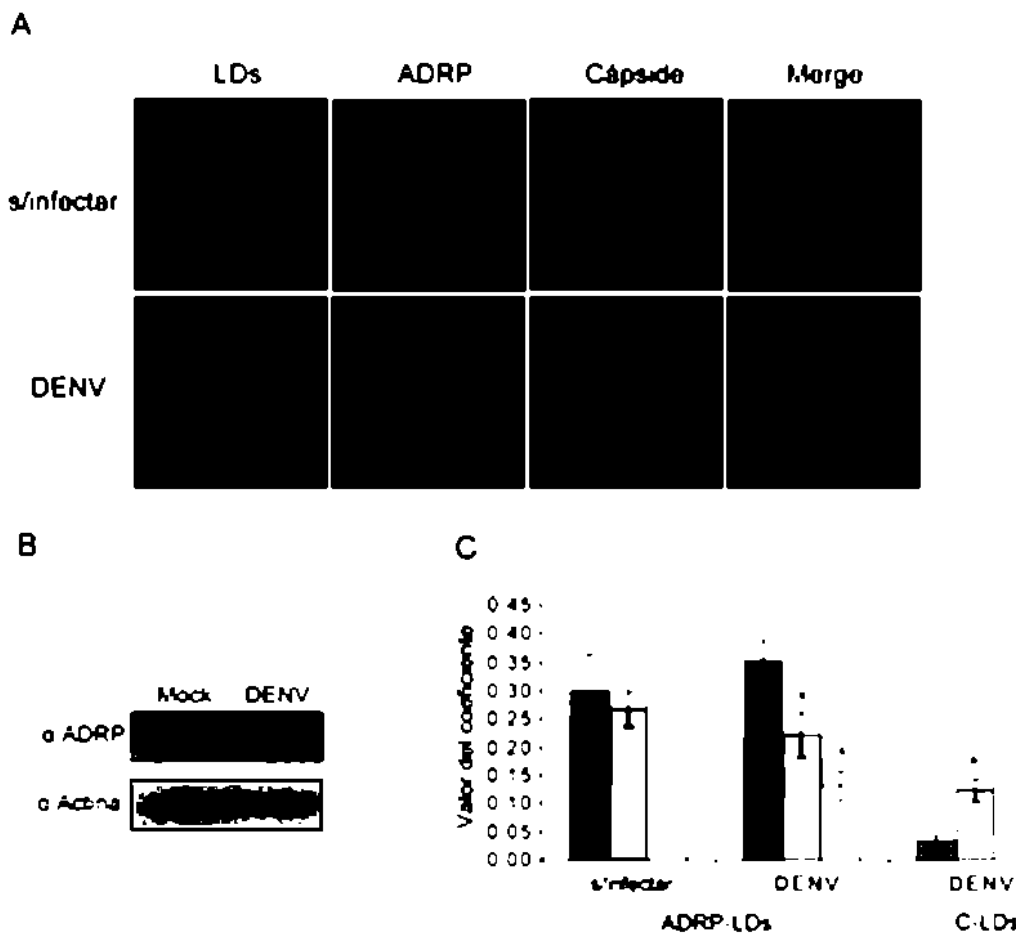


Figura 52. ADRP es desplazada durante la infección con DENV. **(A)** Marcación de la proteína C y ADRP en células A549 infectadas y sin infectar. Células A549 fueron infectadas con DENV (MOI=1), a las 24 h post-infección se realizó la marcación de la proteína C y ADRP con anticuerpos específicos. La tinción de LDs se realizó con BODIPY. **(B)** WB de la proteína ADRP a partir de extractos de células A549 infectadas y sin infectar. **(C)** Colocalización de ADRP-LDs y C-LDs a partir de fotografías obtenidas a las 4, 8 y 24 h post-infección. Los datos corresponden al análisis de las células de cinco campos diferentes en dos experimentos independientes. * significativamente diferente respecto al control (P < 0.05, ANOVA)

ADRP es un factor negativo para la replicación del virus del dengue

Debido a que los niveles de ADRP disminuyen durante la infección viral, se analizó el efecto de la replicación viral en ausencia de ADRP. Para esto, se realizaron experimentos de pérdida de función empleando siRNAs dirigidos contra ADRP. Células A549 y HepG2 fueron tratadas con siRNAs dirigidos contra ADRP y luego infectadas con DENV. Los sobrenadantes de estas infecciones fueron titulados para evaluar la cantidad de PFU producidas (Figura 53A). En ambos tipos celulares la disminución de ADRP produjo un aumento de 10 veces en la cantidad de partículas infectivas producidas respecto a células tratadas con siRNAs control (siRNA NT). Los siRNA dirigidos contra ADRP resultaron ser eficientes, ya que disminuyeron los niveles de ADRP al ser evaluados a través de un ensayo de WB (Figura 53B).

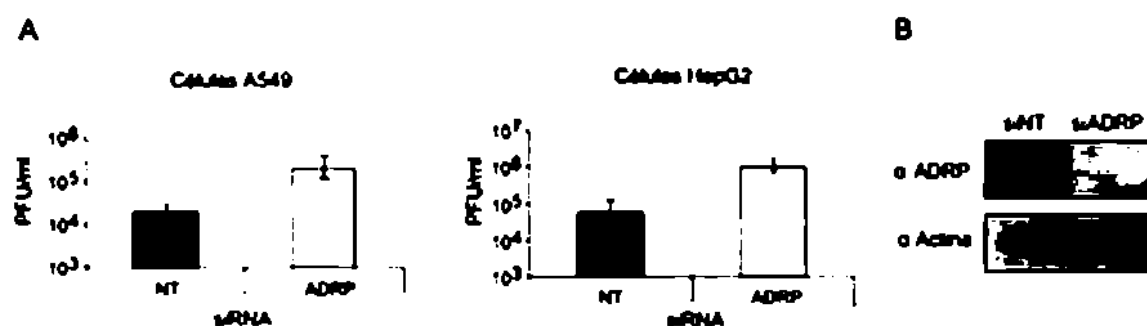
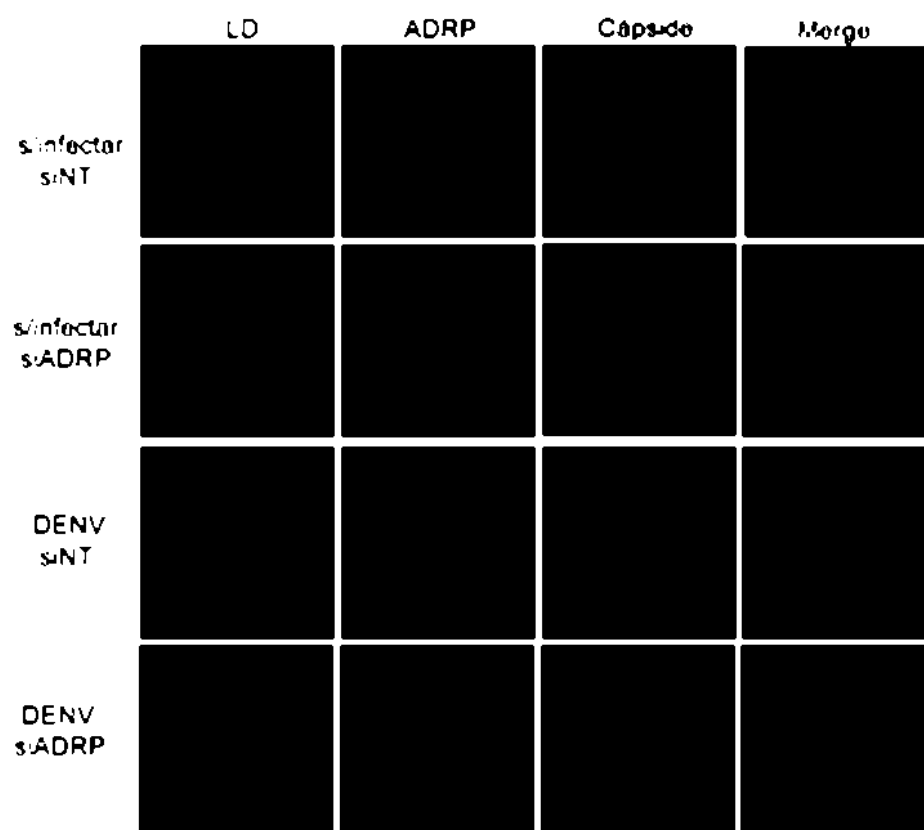


Figura 53. Efecto de ADRP sobre la replicación viral. (A) Células A549 o HepG2 fueron interferidas para ADRP e infectadas con DENV (MOI=0.1). Los sobrenadantes de 48 hs post-infección fueron titulados en células BHK. Los valores representan la media y error estándar de dos experimentos independientes. (B) WB de la proteína ADRP a partir de células tratadas con los siRNAs dirigidos contra ADRP (siADRP) o no relacionado (siNT).

Debido a que ADRP ha sido reportada como una proteína residente de LDs e involucrada en su formación (Chang, Li et al. 2006; Beller, Sztalryd et al. 2008), y que los LDs son necesarios para la replicación del DENV (Samsa, Mondotte et al. 2009); el aumento de la replicación viral frente a la disminución ADRP fue inesperado. Para estudiar los procesos asociados a la replicación viral analizamos la cantidad de LDs en células infectadas con niveles disminuidos ADRP. Para esto, se realizaron ensayos de IF sobre células interferidas contra ADRP y control, tanto infectadas como no infectadas (Figura 54A). La cantidad de LD/célula fue cuantificada para cada uno de los tratamientos. Como se observa, en células tratadas con siRNA NT, la infección viral produjo un aumento del doble en la cantidad de LDs/célula (Figura 54B). Por otro lado, en células sin infectar y deficientes para ADRP, se determinó una disminución a la mitad en la cantidad de LDs/célula, confirmando el rol de ADRP en la formación de LDs. Interesantemente, en células interferidas para ADRP e

infectadas, se observó un incremento en el número de LDs/celula. Estos resultados demuestran que la infección viral es capaz de aumentar o estabilizar la cantidad de LDs aun en ausencia de ADRP. Además, indican que la disminución de los niveles de ADRP favorece la replicación del DENV.

A



B

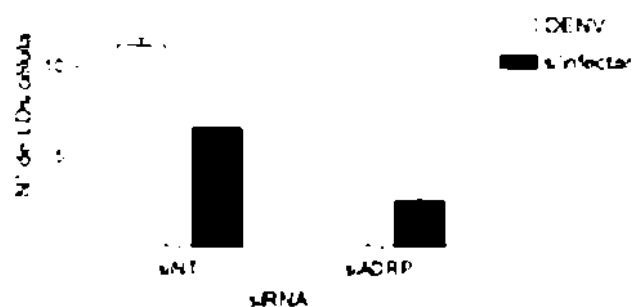


Figura 54. La proteína ADRP afecta la dinámica de los LDs en forma independiente de ADRP. **(A)** Imágenes representativas de células Vero infectadas con DENV y sin infectar, tratadas con los siRNAs contra ADRP (siADRP) o control (siNT) (siNT). Se marcaron las proteínas ADRP (color azul), capsido (color rojo) y los LDs (color verde). **(B)** Cuantificación del experimento mostrado en (A). Los datos corresponden al análisis de las células de cinco campos diferentes en tres experimentos independientes. Significativamente diferente respecto a control. $P < 0.05$ ANOVA.

Asociación de la vía COPI en el transporte de la proteína de cápside a los *lipid droplets*

Recientemente se reportó que el transporte a los LDs de las proteínas ATGL y ADRP depende de componentes de la maquinaria de transporte del ER-Golgi, como los componentes de COPI. Sin embargo se determinó que la proteína TIP47 es transportada a los LDs por un mecanismo independiente de COPI (Beller, Sztalryd et al. 2008, Soni, Mardones et al. 2009).

Debido a que durante la infección viral se observó que la proteína C desplaza a ADRP de los LDs, se decidió investigar si ADRP y C eran transportadas a los LDs por la misma vía. Para determinar esto, se examinó el efecto de la Brefeldina A (BFA), una droga que interfiere con el transporte ER-Golgi. Esta droga actúa estabilizando un complejo abortivo entre la forma unida a GDP de la GTPasa pequeña ARF1, con su GEF, GBF1 (Niu, Pfeifer et al. 2005). Como consecuencia de esto, tanto los efectores de ARF1 como COPI se disocian de las membranas, bloqueando el transporte del cargo desde el ER.

Se realizaron ensayos de IF sobre células A549 infectadas y tratadas con BFA. Se observó que en estas células la proteína C se deslocaliza de LDs (Figura 55). Por el contrario la localización de la proteína TIP47 en LDs no fue afectada en células tratadas. Estos resultados sugieren que la proteína C es transportada a LDs a través de algún efector de ARF1.

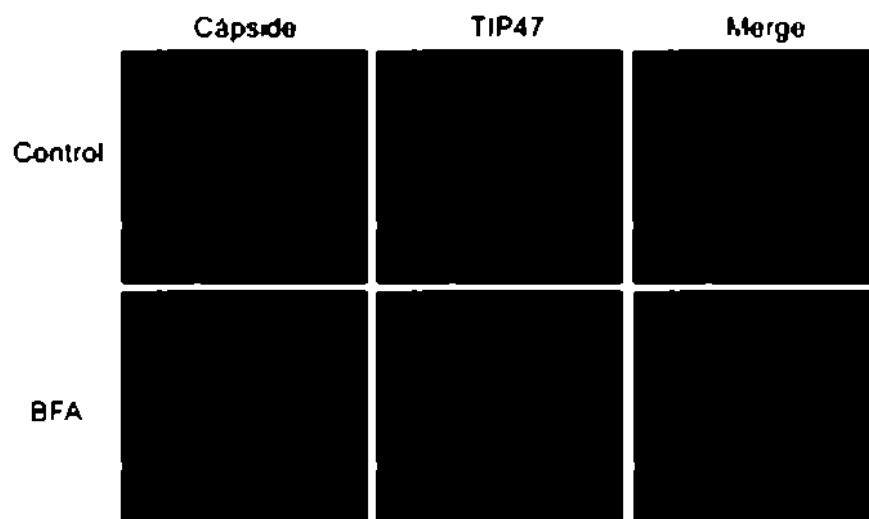


Figura 55. Efecto de la BFA sobre la localización de C en LDs. IF de células A549 infectadas con DENV durante 16hs y tratadas con 2 μ g/ml de BFA durante 5hs.

La Brefeldina A tiene un efecto negativo sobre la producción viral

En trabajos previos se observó que la BFA afecta la replicación del WNV en células de mamífero (Sreenivasan, Ng et al. 1993). Con el objetivo de determinar si la BFA posee algún efecto sobre la replicación del DENV, células A549 infectadas se trataron con distintas concentraciones del inhibidor. Los sobrenadantes de la infección se cosecharon y titularon. Interesantemente, la BFA tuvo un efecto drástico en la producción de las partículas virales, disminuyendo el título viral en más de 10000 veces (Figura 56A).

Con el fin de determinar qué etapa del ciclo viral afecta la BFA, se utilizó el virus reportero mDV-R descrito en el Capítulo 1 de esta Tesis, el cual permite diferenciar las etapas de traducción y replicación del RNA a través de la medida de la actividad luciferasa. Al tratar con BFA células infectadas con mDV-R, se observó que el inhibidor tiene un leve efecto en la traducción y en la replicación viral (Figura 56B). Estos resultados sugieren que la BFA estaría actuando en una etapa posterior a la replicación del RNA, ya que afecta dramáticamente la producción de partículas virales.

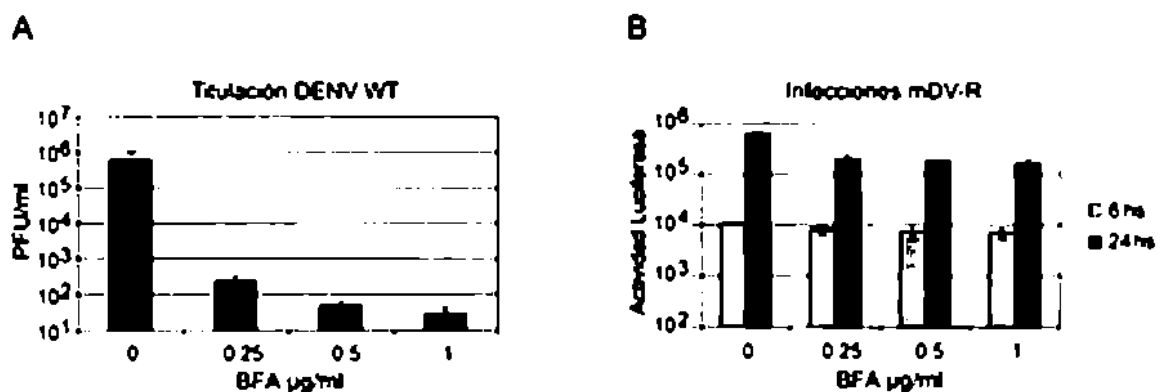


Figura 56. Efecto de la BFA sobre la replicación del DENV. (A) Células A549 infectadas con DENV (MOI=1) se trataron con BFA a las concentraciones indicadas durante 24hs. Los sobrenadantes se titularon en células BHK. (B) Células A549 se infectaron con el virus mDV-R y se trataron con BFA durante 24hs. Se realizó la medida de la actividad luciferasa a las 6 y 24hs post-infección.

La proteína de cápside es transportada a los *lipid droplets* a través de la vía GBF1-ARF1-COP1

Los experimentos anteriores demuestran que la proteína C es transportada a la superficie de los LDs por una vía sensible a BFA. Este inhibidor, actúa estabilizando un complejo abortivo entre las proteínas ARF1 y GBF1. Por esto se analizó si dominantes negativos de ARF1 y GBF1 recapitulaban el efecto de la deslocalización de C en LDs producido por el tratamiento con BFA. Células A549 fueron transfectadas con un dominante negativo de GBF1 (GBF1-E794K) y su versión WT (GBF1-WT); ambos fusionados a GFP. Se observó

que la expresión del dominante negativo disminuyó la localización de C en LDS en un 70% (Figura 57A). Además, se transfectaron células con la construcción dominante negativo para ARF (ARF-T31N) y su versión WT, en este caso con fusiones a YFP. En las células que expresaban ARF-T31N se observó una disminución de un 75% en la localización de C en LDS (Figura 57B). Estos resultados en conjunto, sugieren que la proteína C es transportada a LDS a través de la vía COPI.

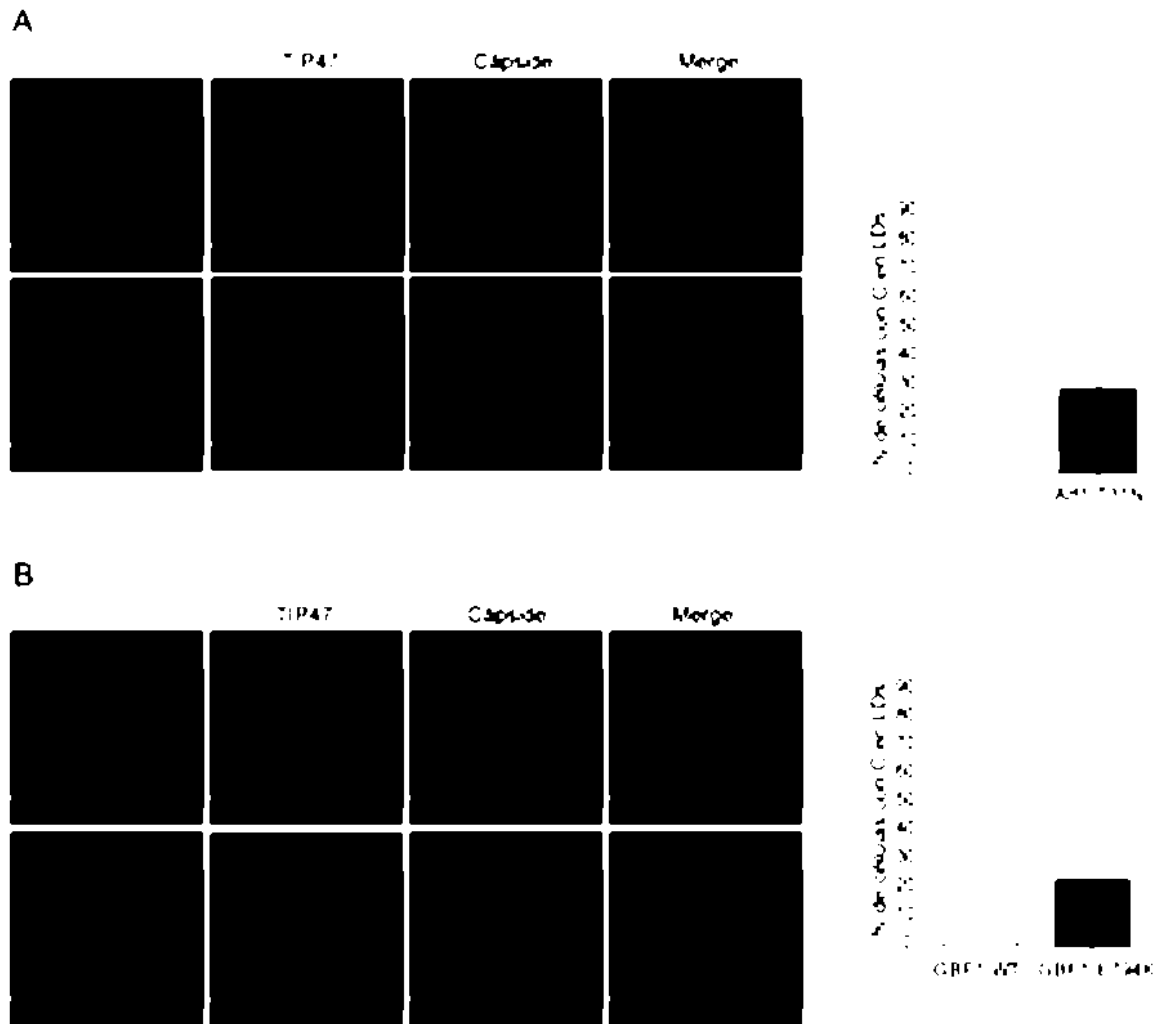


Figura 57. La proteína C es transportada a los LDS a través de la vía COPI. Células A549 fueron transfectadas con plásmidos expresando a Arf1-WT o Arf1-T31N (**A**), o los plásmidos GFP1-WT o GFP1-E794K (**B**). Se cuantificó el % de células con la proteína C localizada en LDS en 100 células en 3 experimentos independientes. *** significativamente diferente respecto al control, $P < 0.001$ ANOVA.

Discusión

En este capítulo, se utilizaron herramientas genéticas para la identificación de nuevas proteínas de la célula huésped involucradas en la replicación del DENV. Se realizó un *screen* genético con el fin de encontrar factores celulares implicados en la replicación viral, y se estudió la interacción entre el virus y las organelas celulares LDs.

Screen genético mediante RNA de Interferencia

Se desarrolló un ensayo de gran escala para la búsqueda de proteínas celulares importantes para la replicación del DENV. Se utilizó como medida de la replicación viral la actividad luciferasa del virus reportero mDV-R, cuyo diseño y caracterización se detallaron en el Capítulo 1 de esta Tesis. El ensayo del mDV-R fue miniaturizado para ser utilizado en placas de 384 pocillos, lográndose una buena sensibilidad y un rango dinámico apropiado para este tipo de experimentos.

Como primera aproximación para evaluar el ensayo del virus reportero en un formato de gran escala, se realizó un *screen* genético de RNAi utilizando bibliotecas de siRNA dirigidas contra todas las quinasas del genoma humano (quinoma). Las quinasas que mostraron una mayor inhibición fueron re-ensayadas en un *screen* secundario. Para eso se emplearon otras líneas celulares y el DENV WT. En estos experimentos se observó una inhibición mayor a 1000 veces en la producción de partículas virales luego de la interferencia de las quinasas EPHB2, CDC42BPA y MAP4K5 (Figura 43). De manera relevante, la interferencia de estas quinasas no afectó la viabilidad de las células, y se demostró su eficiencia mediante ensayos de PCR en tiempo real (Figura 44).

Mediante el uso del virus reportero, se logró determinar que la quinasa EphB2 es necesaria para los procesos de entrada y replicación del genoma viral. Ésta quinasa está involucrada en la regulación de la endocitosis mediada por clatrina (Irie, Okuno et al. 2005). Sugestivamente, la endocitosis mediada por clatrina se ha descrito como una de las maneras por las cual el DENV ingresa a la célula (van der Schaar, Rust et al. 2008). Mediante un análisis bioinformático, se encontró un enriquecimiento significativo de quinasas con dominio Src en el grupo de las quinasas que mostraron inhibición de la replicación del virus en el *screen* primario. Este grupo interactúa con gran afinidad con el dominio citoplasmático de las quinasas del grupo EphB, por lo cual se podría especular en que participen en la misma vía. En línea con lo observado, se ha publicado que el uso de inhibidores contra las quinasas de la familia Src y la interferencia específica por medio de

RNAi de uno de sus miembros, la quinasa c-Src tuvo un profundo efecto inhibitorio sobre la replicación del DENV (Chu and Yang 2007). Además la proteína c-Yes, también miembro de la familia Src fue reportada como un factor requerido para la replicación de WNV (Hirsch, Medigeshi et al. 2005). Notablemente, los resultados de nuestro *screen* muestran que 8 miembros de esta familia estarían involucrados en la replicación del DENV, resaltando la importancia de estas quinasas en la replicación del virus (Figura 49).

La quinasa CDC42BPA/MRCK, involucrada en la formación de fibras de estrés y la contractibilidad celular, mostró estar implicada en el proceso de entrada de la partícula viral a la célula. Sugestivamente, se encontraron otras quinasas relacionadas con la misma vía entre las candidatas del *screen* primario. El uso del compuesto ML-7, inhibidor de la quinasa MLCK e involucrada en la misma vía, produjo una disminución de 100 veces en la producción de partículas virales (Figura 48). Este resultado confirma la importancia de esta vía celular en la replicación de DENV. Estos estudios están en concordancia con un trabajo reciente, en el cual se observó que la desorganización del citoesqueleto de actina por medio del inhibidor Citocalasina D disminuyó drásticamente la producción de partículas virales (Zamudio-Meza, Castillo-Alvarez et al. 2009). Además, se describió que tanto las quinasas Rac 1 como Cdc42 se activan durante la infección viral (Zamudio-Meza, Castillo-Alvarez et al. 2009; Wang, Zhang et al. 2010). La quinasa ROCK 1, involucrada en la misma vía, mostró una importante inhibición de la replicación viral en el *screen*. Sin embargo, el uso de un inhibidor de esta quinasa, Y-27632, no mostró ningún efecto en los ensayos en cultivo realizados (Figura 47). Una posibilidad para explicar esta discrepancia podría basarse en las diferentes metodologías que se utilizaron para bloquear a la quinasa ROCK 1. Durante la interferencia con los siRNAs los niveles proteicos de ROCK 1 disminuyeron casi totalmente durante el ensayo; por lo contrario, el uso del inhibidor sólo tiene un efecto sobre la actividad catalítica de la quinasa. Sin embargo, resultados similares fueron obtenidos por otro grupo, el cual no observó que la inhibición de la vía de Rho tuviese un efecto sobre la producción de partículas virales (Zamudio-Meza, Castillo-Alvarez et al. 2009).

La quinasa MAP4K5/GCKR/KHS, la cual es una activadora de la vía SAPK/JNK, demostró tener un rol muy importante en la replicación del DENV. Se observó una disminución de más de 10000 veces en la producción de partículas virales en células tratadas con siRNAs específicos para MAP4K5 (Figura 43). El uso de shRNA para disminuir los niveles de esta quinasa, mostró el mismo efecto inhibitorio sobre la replicación del virus. La inhibición en la replicación viral observada mediante la interferencia de MAP4K5, pudo ser recapitulada mediante la sobre-expresión de una forma dominante negativo de la quinasa. Este

resultado demuestra el rol específico de esta vía para la replicación del virus. Además, la sobre-activación de esta vía mediante la sobre-expresión de la forma WT de MAP4K5, tuvo un efecto positivo sobre la producción viral, confirmando la importancia de la misma en el ciclo de replicación viral (Figura 50).

El empleo del inhibidor SP600125, el cual tiene como blanco a la proteína JNK, tuvo un efecto negativo sobre la replicación viral de hasta 10 veces (Figura 51). Este resultado abre la posibilidad futura del empleo de Inhibidores de esta vía como terapia antiviral. Además, se ha reportado que la infección por DENV induce la activación de las MAPKs ERK, p38 y JNK, encontrándose que la activación de JNK es esencial para la replicación viral (Ceballos-Olivera, Chavez-Salinas et al. 2010).

Recientemente se publicó un *screen* de RNA de interferencia, con el fin de encontrar factores celulares implicados en la replicación de DENV. Para esto se utilizaron células de *Drosophila melanogaster*, las cuales fueron infectadas con virus adaptados a crecer en este tipo de células. Llamativamente, entre los candidatos encontrados en este trabajo, no hubo similitud con los obtenidos en nuestro *screen* (Sessions, Barrows et al. 2009). Esta discrepancia sugiere que el virus utiliza distintas estrategias y vías celulares para infectar tanto células de insecto como células humanas. Además, resultados de un *screen* de RNAi dirigido contra todo el genoma humano, utilizando a WNV como modelo, sugiere que también existe una gran diferencia entre los factores utilizados por los distintos flavivirus. De los genes candidatos cuya interferencia disminuyó la replicación de WNV, sólo en 36 % tuvo un efecto sobre la replicación del DENV. Además, de este 36% sólo 3 quinasas (CIK1, STK39 y TESK1) también tuvieron un efecto en nuestro *screen* primario (Krishnan, Ng et al. 2008). Es importante resaltar que en este trabajo se utilizaron células HeLa, y nuestro *screen* primario fue realizado en células A549. De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro *screen* secundario, existen diferencias cuando se emplean distintas líneas celulares. Si bien nuestros resultados, junto con los obtenidos por otros grupos, aportan información valiosa sobre la interacción virus-célula, es importante plantear a futuro este tipo de investigaciones en células que actúan como blancos naturales de la infección por DENV.

Interacción de la proteína de Cápside con *lipid droplets*

En la segunda parte de este capítulo se investigó el efecto que tiene la proteína C sobre las proteínas celulares de los LDs. Los resultados obtenidos sugieren que la proteína C se dirige a los LDs utilizando la vía G8F1-ARF1-COPI, descrita recientemente como la vía

por la cual la lipasa ATGL y la proteína ADRP son llevadas a LDs (Soni, Mardones et al. 2009). Se observó que durante la infección viral la proteína celular ADRP es desplazada de los LDs a medida que la proteína C se acumula en éstos (Figura 52). Es posible que la disminución de ADRP en los LDs de células infectadas sea consecuencia de que la proteína C es transportada por la misma vía a LDs, compitiendo ambas proteínas por transportadores de esta ruta. El hecho de que las proteínas ARF1 y COPI1 hayan sido identificadas como proteínas asociadas a LDs a través de análisis proteómicos (Bartz, Zehmer et al. 2007), abre la posibilidad de que estas proteínas actúen directamente a nivel de los LDs para permitir la asociación de C a estas organelas.

Se ha demostrado a través de experimentos de co-inmunoprecipitación que ADRP interacciona con la forma de ARF1 unida a GTP. Además, esta interacción fue suprimida mediante el agregado de BFA (Nakamura, Akashi et al. 2004). Nuestras observaciones muestran que tanto el agregado de BFA como el empleo de los dominantes negativos de ARF1 y GBF1 disminuyen la localización de C en LDs (Figuras 55 y 57). Además, el empleo de BFA tuvo un efecto drástico sobre la producción de partículas virales (Figura 56). Siguiendo esta lógica, es posible especular acerca de la existencia de una interacción directa de C con ARF1 en forma similar a como ocurre con ADRP. Serán necesarios nuevos experimentos para dilucidar esta posibilidad. A favor de la hipótesis de una competencia entre C y ADRP por ocupar la superficie de los LDs, se encontró que ADRP resultó ser un factor negativo para la replicación viral, ya que su ausencia produjo un aumento de 10 veces en la producción viral (Figura 53). Esta observación es muy importante porque demuestra que mediante la manipulación de las proteínas de la célula huésped asociadas a LDs es posible alterar la eficiencia de la producción viral.

ADRP ha sido reportada como una proteína involucrada en la síntesis de LDs (Imamura, Inoguchi et al. 2002). A través de experimentos de pérdida de función de ADRP se observó este efecto, visualizándose una disminución significativa en el número de LDs/célula. Llamativamente, en células infectadas e interferidas para ADRP, se midió un aumento en el número de LDs similar al observado en células infectadas pero no interferidas (Figura 54). Este resultado sugiere que la proteína C puede incrementar la cantidad de los LDs aún en ausencia de ADRP. En línea con estas observaciones, recientemente ha sido descrito que el DENV modula la biosíntesis de los ácidos grasos incrementando la síntesis de lípidos en los complejos de replicación (Heaton, Perera et al. 2010) y que la regulación del metabolismo de los lípidos es crítica para la replicación del virus (Heaton and Randall 2010).

La relación entre la replicación viral con el metabolismo de lípidos y de los LDs es un área de investigación que está emergiendo como un tema de central importancia para distintos patógenos. Cabe destacar que formas más graves de la enfermedad del dengue se han asociado con cambios en el perfil lipídico, observándose una disminución del colesterol total y lipoproteínas de baja y alta densidad y triglicéridos (van Gorp, Suharti et al. 2002; Villar-Centeno, Diaz-Quijano et al. 2008). Además, ha sido descrito que la citoquina MIF (migration inhibitory factor), la cual se incrementa en el plasma de pacientes con dengue y contribuye a la patogenia, se acumula en los LDs de los leucocitos de estos pacientes (Assuncao-Miranda, Amaral et al. 2010). Estos resultados refuerzan el concepto de la importancia de los LDs y el metabolismo de lípidos durante la replicación del DENV. Sin embargo, serán necesarias nuevas investigaciones para entender mejor la relación del virus con los LDs y su función en el ciclo de replicación viral.

En resumen, en este capítulo se encontraron nuevas proteínas de la célula huésped involucradas en las distintas etapas de la replicación del DENV. El virus reportero desarrollado en el contexto de esta tesis, demostró ser una poderosa herramienta genética para la búsqueda y caracterización de los factores celulares necesarios en el ciclo de vida del DENV. La identificación de factores celulares implicados en la replicación del virus es imprescindible para generar conocimiento acerca de las estrategias de replicación viral. Además, este conocimiento puede ser importante para la generación de terapias virales que tengan como blanco algún factor celular necesario para la replicación del virus.

Conclusión general

El estudio de las interacciones de los virus con la célula huésped ha surgido en los últimos años como uno de los campos en la virología con mayor crecimiento. Esto ha sido posible debido al desarrollo de nuevas tecnologías, que emplean formatos de gran escala para la búsqueda de nuevos factores celulares implicados en la replicación de los virus. Entre otras técnicas se pueden nombrar al uso de *microarrays*, *screen* genéticos de siRNAs y últimamente el empleo de *deep sequencing* y de *screens* proteómicos. El descubrimiento de nuevos factores celulares abre la posibilidad de entender profundamente las interacciones célula-virus, y al hallazgo de nuevos blancos terapéuticos antivirales (Peng, Chan et al. 2009)

En el caso particular del DENV, el conocimiento de su biología molecular, y de la interacción de éste con la célula huésped, es aún muy limitado. Esto ha dificultado en parte el desarrollo racional de vacunas y terapias antivirales (Wilder-Smith, Ooi et al. 2010).

El objetivo de esta tesis fue el estudio de las interacciones del virus del dengue con la célula hospedadora. Este fue un objetivo ambicioso, ya que al comienzo de esta tesis no se contaba con las herramientas necesarias para llevar a cabo este tipo de estudios. Así, en una primera etapa el estudio se focalizó en el diseño y desarrollo de virus reporteros, herramientas importantes para el estudio de la biología del virus. Con el fin de obtener un virus reportero, se clonaron exitosamente diferentes proteínas reporteras colocando estas en distintas posiciones del genoma viral. Estos virus replicaron exitosamente, expresando los genes foráneos. Esto posibilitó el seguimiento de la replicación viral a través de un ensayo de actividad luciferasa, o mediante la medida de la fluorescencia de GFP. Además, a través de estos ensayos pudimos disecar las distintas etapas del ciclo viral (Capítulo 1). Los virus reporteros resultaron en herramientas muy útiles para el estudio de la biología molecular del virus. A través de su uso se pudo determinar el mecanismo de acción de drogas antivirales y actualmente está siendo utilizado en colaboración con otros laboratorios para la búsqueda de nuevos inhibidores de la replicación del virus.

Debido a la experiencia ganada en la manipulación de clones infecciosos, a la ausencia de un clon infeccioso local, y al aumento de casos de dengue en nuestro país; decidimos desarrollar un clon infeccioso de dengue a partir de un aislamiento argentino. Esto planteó un desafío metodológico y técnico, pero finalmente pudimos obtener un clon infeccioso a partir de un aislamiento clínico local. El mismo fue caracterizado, observándose claras diferencias de fenotipo y de crecimiento con otros aislamientos de DENV (Capítulo 1). Este

nuevo clon infeccioso abre las posibilidades a nuevos estudios con el fin de encontrar determinantes de patogenicidad y virulencia en el genoma viral.

Mediante el empleo de clones infecciosos y de los virus reporteros obtenidos, se estudió la importancia de la N-glicosilación de las proteínas estructurales del DENV en la interacción con la célula huésped. Así, se encontró que los sitios potenciales de N-glicosilación de E, Asn 67 y Asn 153 son utilizados tanto en células de mosquito como de mamífero. Asimismo, se determinó que la glicosilación en la Asn 67 de E tiene un rol esencial en la propagación viral en células de mamífero, sin afectar el proceso de entrada, traducción y replicación del virus. Además, utilizando el virus reportero, se pudo desarrollar un ensayo de trans-complementación genética, a través del cual se comprobó el rol esencial de la glicosilación de prM para la producción de partículas virales (Capítulo 2).

Haciendo uso de las nuevas herramientas genéticas, se llevó a cabo un *screen* de RNA de interferencia. El mismo fue diseñado con el fin de encontrar quinasas celulares implicadas en la replicación del DENV. Se utilizó como lectura del *screen* la actividad luciferasa del virus reportero, poniendo a punto un ensayo miniaturizado adecuado para estos estudios. A partir del *screen* se descubrieron nuevas proteínas celulares implicadas en la replicación del DENV. Además, se validó la relevancia de estas proteínas en la replicación del virus utilizando otras metodologías (Capítulo 3).

Finalmente, el ensayo de RNA de Interferencia desarrollado permitió estudiar la interacción de las proteínas residentes en los LDs con la replicación del DENV. Así, se identificó a la proteína celular ADRP como un factor negativo en la replicación viral. Además, se obtuvieron resultados que sugieren que la vía celular GBF1-ARF1-COPI es utilizada para el transporte de C a los LDs (Capítulo 3).

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis aportan nuevas herramientas y conocimientos fundamentales para comprender la interacción del DENV con la célula huésped.

Materiales y métodos

1) Generación de herramientas genéticas

Clon Infeccioso de Salta

La construcción pBeloBac.MCS fue derivada del pBeloBac11 (Shizuya, Birren et al. 1992). Para esto, al pBeloBac11 se le extrajo un fragmento no esencial liberado con la digestión con *Not* I, y se lo sustituyó por un sitio múltiple de clonado (MCS) con los sitios de restricción *Mlu* I, *Sph* I, *Sac* I, *Eag* I, *BstB* I, *Pme* I, *Nhe* I, *Xho* I y *Asc* I: para facilitar la inserción direccional del cDNA del Clon Salta. El MCS fue generado mediante PCR, y se utilizó como molde el gen de la luciferasa de Renilla (con el fin de aumentar el tamaño de producto de PCR y facilitar el clonado posterior) y los oligos AVG 1099/AVG 1100 (ver secuencias en apéndice). El producto de PCR se digirió con *EcoR* V y se clonó en el pBeloBac11. Este último fue previamente digerido con *Not* I y tratado con la DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment (Promega), para hacer romos sus extremos.

El RNA del aislamiento viral 67655 se purificó utilizando Trizol LS (Invitrogen) según las especificaciones del fabricante. El RNA fue reversamente transcrito con oligos *random* (Invitrogen). Los fragmentos de cDNA se amplificaron por PCR, con la DNA polimerasa de alta fidelidad AccuPrime™ Pfx (Invitrogen). Para las PCRs se utilizaron los siguientes pares de oligos específicos: RT-PCR 1: AVG 273 (Promotor de T7 + 5'UTR)/ AVG 1101 (agrega sitio *Sph* I); RT-PCR 2: AVG 1102 (agrega el sitio *Sph* I)/ AVG 1103 (agrega el sitio *Sac* II); RT-PCR 3: AVG 1104 (agrega el sitio *Sac* II)/ AVG 1121 (sobre *Eag* I); RT-PCR 4: AVG 1122 (sobre sitio *Eag* I)/ AVG 1123 (sobre sitio *BstB* I); RT-PCR 5: AVG 1124 (sobre sitio *BstB* I)/ AVG 1125 (agrega el sitio *Pme* I); RT-PCR 6: AVG 1126 (agrega el sitio *Pme* I)/ AVG 1127 (sobre el sitio *Nhe* I); RT-PCR 7: AVG 1128 (sobre el sitio *Nhe* I)/ AVG 1129 (agrega los sitios *Xho* I y *Asc* I). Los productos de RT-PCR se purificaron y clonaron en el plásmido pGEM-T. Luego se secuenciaron para verificar que la secuencia fuese la misma que la del aislamiento original. El clonado de los siete fragmentos se realizó en forma secuencial en el plásmido pBeloBac.MCS hasta obtener el pBeloBac.DENV2.Salta (Clon Salta), el cual contiene el cDNA completo del aislamiento 67655.

Virus reporteros bicistronicos

Los virus reporteros bicistronicos se obtuvieron a partir del clon infeccioso pD2/IC-30P-A que fue cedido por el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (Kinney, Butrapet et al. 1997). Este plásmido contiene el cDNA del genoma completo de la cepa 16681 de

DENV-2. Al mismo se le adcionó un sitio *Afl* II, dando origen al plásmido pD2/ICA*Afl* II (Alvarez, Lodeiro et al. 2005).

Los virus monocistrónicos con los genes de la luciferasa de Renilla (DV-R) o EGFP se construyeron a partir de la fusión del IRES de EMCV con el gen de la luciferasa de Renilla generada mediante una PCR de ensamblaje usando los siguientes oligos: PCR 1: AVG 428/AVG 481 y PCR 2: AVG 480/AVG 387. La fusión EMCV-GFP se realizó con los siguientes oligos: PCR1: AVG 428/AVG 384 y PCR 2: AVG 429/AVG 381. Los productos de estas PCRs se digirieron con las enzimas *Hpa* I-*Afl* II y se clonaron en el plásmido pGEM-3'UTR-*Afl*II (Alvarez, Lodeiro et al. 2005). De esta forma se generaron los plásmidos con la fusión IRES-Renilla-3'UTR.DENV o IRES-EGFP-3'UTR.DENV. Estos plásmidos se digirieron con *Stu* I-*Afl* II y los fragmentos de DNA se clonaron dentro del plásmido pD2/ICA*Afl* II para obtener el cDNA del DV-R y del DV-GFP.

Para generar el virus DV-RN67Q, el plásmido pD2.N67Q se digirió con *Sac* I-*Sph* I y el fragmento conteniendo la mutación N67Q se clonó en pDV-R.

Virus reporteros monocistrónicos

El cDNA del mDV-R se obtuvo partir del plásmido pD2/ICA*Afl* II, con un sitio *Not* I en el nucleótido 244 (pD2/ICA*Afl* II-*Not* I). Para facilitar la inserción del gen de la luciferasa de Renilla (Rluc) dentro del pD2/ICA*Afl*II-*Not*I, se generó un plásmido intermedio derivado del pRL-CMV (Promega). Se usaron los sitios únicos de restricción *Sac* I y *Bst*B I presentes río arriba de la Rluc en el pRL-CMV, y se introdujo el 5'UTR completo seguido de los primeros 104 nucleótidos de la secuencia codificante del virus. Para esto se usaron los oligonucleótidos AVG 101/AVG 7. El plásmido resultante se usó para introducir el sitio de la proteasa de FMDV2A río abajo de la Rluc, fusionado a la secuencia de la proteína de cápside. El fragmento con FMDV2A fusionado a las secuencias de dengue, se generó por PCR de ensamblaje usando los siguientes oligos, PCR 1: AVG 273 /AVG 516 y PCR 2 : AVG-517/AVG-241. La PCR resultante se digirió con *Sac* I-*Not* I y se clonó con los mismos sitios en el plásmido pD2/ICA*Afl* II-*Not* I. Para clonar la mutación N69Q de prM en el virus mDV-R, se realizó la siguiente PCR de ensamblaje: PCR 1: AVG 163 /AVG 654 y PCR 2: AVG 655/AVG 239. La misma se clonó en el mDV-R entre los sitios *Not* I-*Sph* I.

La construcción mDV-R_{Salta} se obtuvo a partir del bácmido pBeloBac.DENV2_{Salta}. Se utilizó el plásmido intermedio pGEM (5' Renilla 2A *Not* I), el cual tiene clonado el gen de la luciferasa de Renilla. Se realizó una PCR con los oligos AVG 1156/AVG 1104. La misma se clonó entre los sitios *Hind* III/*Sph* I en el plásmido intermedio pGEM (5' Renilla 2A *Not* I). Posteriormente se clonó la PCR AVG 273/AVG 1155 en el plásmido intermedio entre los

sitios *Sac I* / *BstB I*. De esta forma se obtuvo el plásmido pGEM (5' Renilla 2A *Not I*). Salta, el cual finalmente se clonó en el pBeloBac.DENV2.Salta entre los sitios *Mlu I* / *Sph I*.

Para obtener la construcción mDV-GFP, se realizó una PCR con los oligos AVG 417/418, utilizando como molde al gen de la EGFP. El producto de PCR se cortó con *Aat II* y se clonó en el plásmido pGL5lucFu 2A NS1-2A. El plásmido resultante (pGL5.GFP.Fu 2A NS1-2A) se digirió con *Sac I*-*Hind III* y se clonó en el plásmido pGEM 5' Renilla2A *Not I*. Finalmente, el plásmido resultante (pGEM 5'GFP.2A *Not I*) se digirió con *Sac I*-*Not I* y se clonó en el plásmido pD2/ICAfl II-*Not I*.

Para obtener la construcción mDV-Ff, el plásmido pGL5lucFu 2A NS1-2A se digirió con *Hind III*-*Sac I*. El fragmento con el gen de la luciferasa se clonó en el plásmido pGem (AVG 241-517/AVG 516-273) cortado con las mismas enzimas de restricción. El plásmido resultante se cortó con *Sac I*-*Not I* y se clonó en el plásmido pD2/ICAfl II-*Not I*.

Generación de virus mutantes de N-glicosilación

Los virus mutantes de N-glicosilación se obtuvieron a partir del clon infeccioso pD2/ICAfl II. Para facilitar el clonado de las mutaciones, se generó el plásmido intermedio pGem.*Sph I*-*Nsi I*. El mismo incluye el fragmento obtenido por la digestión del plásmido pD2/ICAfl II con las enzimas *Sph I* / *Nsi I*. La mutación N153Q en la proteína E se introdujo en el pGem.*Sph I*-*Nsi I* con los oligos AVG 408/AVG 410. El fragmento de PCR se cortó con *Sph I*-*Hpa I* y se clonó en pGem.*Sph I*-*Nsi I* usando las mismas enzimas de restricción. El plásmido resultante se cortó con *Sph I*-*Nsi I*, y el fragmento se clonó dentro del plásmido pD2/ICAfl II, para generar el plásmido pD2.N153Q. La mutación N67Q en la proteína E se generó por medio de una PCR de ensamblaje con los siguientes oligos. PCR1: AVG 101/AVG 411 y PCR2: AVG 412/AVG 239. El fragmento de PCR se digirió con *Sac I* / *Sph I* y se clonó directamente dentro del pD2/ICAfl II. De esta forma se obtuvo el plásmido pD2.N67Q. Para obtener el doble mutante N67Q.N153Q, el pGem.*Sph I*-*Nsi I* (con la mutación N153Q) se cortó con *Sph I*-*Nsi I* y el fragmento resultante se clonó en el pD2.N67Q para así generar el pD2.N67Q.N153Q.

Para obtener el virus mutante de glicosilación para prM (pD2.N69Q), se realizó la siguiente PCR de ensamblaje. PCR 1: AVG101/ AVG 655 y PCR 2: AVG 654/ AVG 239. La misma se digirió con *Sac I*-*Sph I* y se clonó en el plásmido pD2/ICAfl II.

Construcción de los plásmidos de expresión de sE de DENV

Las secuencias de las formas maduras de prM y E se obtuvieron por PCR de los plásmidos pD2/ICAfl II, pD2.N67Q y pD2.N153Q. Estas se usaron para generar los virus SFV recombinantes, codificando para prM y el ectodominio de E (sE, aminoácidos 115 y 674 de

la poliproteína). Las secuencias de prM y sE, se amplificaron por PCR con los oligos sentido 5'-ATATTGCGCGCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTATTC ATTGGGGTGAATTGCTTCCATTTAACCACACGT-3' y antisentido 5'-ATATTATG CATCTAGG CGGGGGCCACCTGGGAGGTCTCGGTTCCTTTCTTAAACCAGTTGAGCTTCAG-3'. Los oligos sentido y antisentido codifican para el péptido señal de virus de la stomatitis vesicular (MKCLLYLAFLFIGVNC) y el epítopo 1D4 (TETSQVAPA), respectivamente. Las secuencias amplificadas se cortaron con *BssH* II y *Nsi* I, y se introdujeron en el vector pSFV2 (Liljestrom and Garoff 1991).

2) Cultivo de células y análisis de la replicación viral

Medios de cultivo y líneas celulares

Las líneas celulares Huh-7 (de hepatoma humano), Vero (de riñón de mono verde africano) y BHK (de riñón de hámster) se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células A549 (de carcinoma alveolar humano) se cultivaron en medio DMEM-F12 suplementado con SFB 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. La línea celular HepG2 (de carcinoma de hígado humano) se creció en MEM suplementado con 0,03 % de glutamina, 0,01 % de piruvato de sodio, 10 % de SFB y 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células Raji son células no adherentes provenientes de la línea B humana. Las células Raji expresando DC-SIGN se generaron usando vectores retrovirales. Las células Raji se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % SFB, 100 U/ml de penicilina. Las células dendríticas se generaron a partir de monocitos humanos (Lozach, Amara et al. 2004). Las células C6/36 de larva del mosquito *Aedes albopictus*, se mantuvieron en estufa a 28 °C en medio Leibovitz L-15 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

Plásmidos

El clon infeccioso pD2/IC-30P-A fue cedido por CDC. Los plásmidos pSIREN-RetroQ.GCKR, pSIREN-RetroQ.Luc, pCRII-GCKR y pCRII-GCKRT178A fueron cedidos por Dr. John H. Kehrl. Las construcciones de ARF1 fusionadas a GFP (WT y dominante negativo), de GBF1 fusionadas a YFP (WT y dominante negativo) fueron cedidas por Dr. Juan S. Bonifacio.

Stocks virales

Los virus del aislamiento DENV2 16681 fueron obtenidos a partir de la síntesis *in vitro* de RNA genómico y transfección en células BHK o C6/36. El aislamiento clínico DEN2 67655 fue cedido por el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" (INEVH). El DENV NGC fue cedido por la Dra. Laura Talarico.

Anticuerpos

Los anticuerpos ascíticos hiper-inmune de ratón anti DENV2 fueron cedidos por el Dr. Philippe Despres, y se utilizaron en los ensayos de IF (dilución 1/200). El anticuerpo monoclonal anti E (mAb E18) fue cedido por el Dr. Michael Diamonds, y utilizado para detectar la proteína E por WB (1/500). El anticuerpo anti-DENV-2/403 fue cedido por la Dra. Elsa Damonte y utilizado para los ensayos IP (1/50). El anticuerpo policlonal anti C fue obtenido en nuestro laboratorio mediante la inmunización de los animales con proteína C recombinante. Para la detección de ADPR fueron usados los anticuerpos: Guinea Pig anti-Adipophilin para detección en WB (1/1000), y mAb Adipophilin para ensayos de IF (1/100); ambos anticuerpos de Fitzgerald Industries International. Para la detección de TIP47 se utilizó el anticuerpo Guinea pig anti-TIP47 (1/100, Fitzgerald Industries International). El anticuerpo mAb 1D4, que reconoce al epítopo de C9 fue obtenido de la University of British Columbia, Vancouver. El anticuerpo anti E mAb4G2, fue utilizado para los ensayos de FACS y fue obtenido de LGC Promochem. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: Goat anti-rabbit IgG Cy3 conjugated (Jackson Immuno Research), Cy5 AffiniPure Donkey Anti-mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch) y Alexa Fluor 488 (Molecular Probes).

Compuestos

Se utilizaron los siguientes compuestos: ML-7 Hydrochloride (Calbiochem), SP600125 (Calbiochem), Brefeldina A (Sigma), Heparina (Sigma), análogo estructural de la adenosina 2'-C-metiladenosina (cedido por Novartis).

Preparación de moldes de DNA para el ensayo de transcripción *in vitro*

Los plásmidos derivados de la construcción pD2/ICA/II se prepararon a partir de 50 ml de cultivo de una colonia de bacterias (XL1-blue) crecida toda la noche en LB/ampicilina 100 µg/ml. Los plásmidos derivados del pBeloBac 11 se prepararon a partir de 100 ml de cultivo de una colonia de bacterias (DH10B) crecida toda la noche en LB/cloranfenicol 30 µg/ml. La purificación se realizó utilizando columnas de sílica según las instrucciones del kit de Miniprep QIAprep (QIAGEN).

Con el fin de obtener los moldes lineales adecuados para realizar una transcripción *in vitro*, los plásmidos derivados de la construcción pD2/ICA/II se cortaron con *Xba* I, mientras que los plásmidos derivados de construcción pBeloBac.Clon Salta se digirieron con *Xho* I. Luego de la digestión se extrajo la mezcla de reacción con una parte de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 24:24:1 (Sigma). Se tomó la fase acuosa y se agregaron 5 µg de glicógeno, una décima parte de acetato de sodio 3M y tres partes de etanol absoluto. El DNA lineal se precipitó por centrifugación, se lavó con etanol 70 % y se resuspendió en 20 µl de agua milliQ.

Síntesis de RNA genómico por transcripción *in vitro*

Las reacciones de transcripción *in vitro* se realizaron en un volumen final de 30 µl, en buffer de reacción Tris-HCl 40 mM (pH 7.5), MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM y 50 µg/ml BSA. Se utilizaron 0,5 µg de molde de DNA lineal para la transcripción con 40 U de polimerasa de RNA T7 (Ambion) en presencia de CTP, GTP y UTP 2mM, 0,4 mM de ATP y análogo estructural de cap m7GpppA 2 mM (New England Biolabs). Luego de 2 hs de reacción a 37°C, se trataron las muestras con DNasa I (Ambion) por 20 minutos. La determinación de la concentración se realizó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm de una dilución de la muestra y mediante la corrida de la muestra en geles de agarosa.

Transfección de RNAs genómicos y producción de virus

Para la transfección de RNAs genómicos de los clones infecciosos y de los virus reporteros se realizaron transfecciones de células BHK-21, C6/36 y A549 crecidas en monocapa hasta una confluencia del 60-70 % en placas de 24 pocillos. Se prepararon diluciones de 100 ng de los RNAs en 50 µl de Opti-MEM 1 (Gibco) y se mezclaron con una 0.5-1 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en 50 µl de Opti-MEM 1, siguiendo las instrucciones del proveedor para la transfección de las células. Las transfecciones se realizaron por duplicado y los experimentos se repitieron independientemente al menos dos veces.

Para la producción de stocks virales de los virus reporteros, se transfectaron células BHK o C6/36 en placas de 100 mm o frascos T-75, respectivamente. Se emplearon 6 µg de RNA genómico, usando 30 µl de Lipofectamina 2000. A partir del día 2 (BHK) o 4 (C3/36) post-transfección los sobrenadantes fueron cosechados, agregándose a las células medio fresco. La colección de sobrenadantes fue evaluada para la presencia de virus, infectando células BHK y midiendo actividad luciferasa a las 48 hs post-infección.

Infección viral

Las infecciones con los virus DENV WT, reporteros y mutantes, se realizaron incubando el inóculo viral durante 1h a 37 °C, con agitación suave cada 10 minutos. Pasado este tiempo

se completaron las células con medio de cultivo fresco 2 % SFB. La presencia de replicación y producción viral fue evaluada a través de ensayo de IF, ensayo de placa de lisis, PCR en tiempo real o ensayo de actividad luciferasa de acuerdo al experimento y virus empleado.

Ultracentrifugación de stocks virales

Con el fin de determinar la cantidad de proteína E secretada de células BHK, estas se crecieron en placas de 100 mm, y el medio fue colectado a diferentes tiempos post-infección. Este fue ultra-centrifugado a 4 °C por 3hs a 140.000 x g, y los virus fueron resuspendidos en 300 µl de PBS. Se realizó el análisis de las muestras por WB, sembrando 30 µl de cada una en un gel SDS-PAGE 9%.

Medida de actividad luciferasa

Para cuantificar la actividad luciferasa de Firefly y de Renilla, se utilizaron los kits comerciales Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) y Renilla Luciferase Assay System, respectivamente (Promega). La cuantificación de las actividades se realizó en un lector de luminiscencia Veritas (Turner BioSystems) utilizando placas de 96 pocillos de fondo blanco (Greiner Bio-One). Los ensayos fueron realizados por duplicado, en por lo menos dos experimentos independientes. Se graficaron los valores medios y los errores estándar.

Medida de fluorescencia

Para la medida de fluorescencia de las células infectadas con el virus mDV-GFP, éstas se crecieron en placas negras de 96 pocillos con fondo transparente (Greiner Bio-One). De esta manera se pudieron emplear directamente estas placas para la medida de la actividad. Para la cuantificación de la fluorescencia se utilizó un lector DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter). Los ensayos fueron realizados por quintuplicado, en por lo menos dos experimentos independientes. Se graficaron los valores medios y los errores estándar.

Ensayo de citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad de los siRNAs y de los compuestos ensayados, se utilizó el kit comercial Cell Titer Glo (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Transfección de RNAs de Interferencia

Para la transfección de los siRNAs en un formato de 24 pocillos, se plaquearon 40000 células A549, HeLa o HepG2/pocillos. Al día siguiente se realizó la transfección de los siRNAs. Se diluyó 1 µl de Lipofectamina 2000 en 25 µl de Optimem. Por otro lado, se diluyeron 6,7 pmol de cada siRNA en 25 µl de Optimem. Luego se agregó la mezcla de

transfección a los siRNAs diluidos, incubado a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. La mezcla de transfección se agregó por gotas a las células, conteniendo éstas un volumen ajustado de 450 μ l de medio 10% SFB. Las células se incubaron durante 48 hs, para proceder luego a realizar los diferentes ensayos (infecciones, medida de citotoxicidad, extracción de RNA, preparación de extractos por WB).

Screens de RNAs de Interferencia de gran escala

Se utilizaron dos bibliotecas comerciales de siRNAs dirigidas contra el quinoma humano. Una biblioteca con 2172 siRNA dirigidos contra 543 quinasas (IDT, Coralville, IA), y otra con 1290 siRNAs dirigidos contra 645 quinasas (Invitrogen, Carlsbad, CA). Estas bibliotecas poseen los siRNAs sembrados en placas de 384 pocillos, adecuadas para el cultivo de células. Por esta razón, se realizó la transfección reversa, agregando a cada pocillo las células y los reactivos de transfección.

Por cada pocillo, 10 μ l de Optimem (Invitrogen) se mezclaron con 45 nl de Lipfectamina 2000 (Invitrogen). La mezcla se dejó incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, 1500 células A549 por pocillo, (resuspendidas en medio DMEM F-12 20 % SFB) se adicionaron a las placas. Finalizada la incubación, la mezcla de transfección se agregó a cada pocillo conteniendo las células. Pasadas 48 horas luego de la transfección, el medio fue retirado y se procedió a la infección con el virus mDV-R. Para esto se utilizaron 10 μ l de stock viral/pocillo, incubándose los virus durante 1h a 37 °C, con agitación suave. Pasado este tiempo, se adicionaron a cada pocillo 25 μ l de DMEM F-12 2% SFB. A las 48hs post-infección se procedió a la lectura de la actividad luciferasa. Se utilizó el kit comercial Renilla Luciferase (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para la medida de citotoxicidad se utilizó el kit comercial CellTiter-Glo (Promega). Todos los pasos fueron realizados utilizando el sistema robótico integrado para screens de gran escala disponible en GNF.

Los resultados de cada screen fueron analizados con programas de propiedad de GNF, diseñados específicamente para asegurar la calidad de los datos y predecir estadísticamente la presencia de *outliers* en los datos. Todos los datos fueron graficados y representados en un "heat map", el cual muestra la actividad de cada siRNA dentro de la placa de 384 pocillos. Los errores sistemáticos fueron marcados y descartados para posteriores análisis. Se calculó el promedio de la inducción/represión para todos los pocillos a través de la normalización del valor de cada pocillo con las medias de su respectiva placa. Estos valores, luego fueron expresados como log₂, para producir una distribución más normalizada de los datos. Luego, fue determinado el promedio de

replicas, y transformados como $\log_2 (2^{\Delta x})$. Este último valor fue llamado AFA, por *average fold activation*. Para evaluar la varianza entre los replicados, la desviación estándar de los valores normalizados por \log_2 fue calculada transformada por la inversa del \log_2 . Este valor fue llamado MFA. El promedio final de valor (AFA) fue dividido por MFA, con el fin de penalizar los pocillos con poca reproducibilidad entre los replicados.

Aislamiento de RNA viral, RT-PCR y secuenciación

Se empleó Trizol LS (Invitrogen) para extraer el RNA, siguiendo las especificaciones del fabricante. El RNA purificado se utilizó como molde en una reacción de transcripción reversa (RT) para obtener el cDNA de la región de interés. La reacción de RT se realizó en 20 μ l finales utilizando 200 unidades de transcriptasa reversa Array Script (Ambion) y 200 pmoles de oligonucleótido, siguiendo las indicaciones del proveedor. El cDNA obtenido fue utilizado como molde para reacciones de PCR o PCR en tiempo real, de acuerdo al propósito del experimento realizado.

Los productos de RT-PCR se purificaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se secuenciaron empleando un equipo ABI 377 y la química BigDye Terminator (Applied Biosystems).

PCR en tiempo real

El RNA viral se cuantificó por reacción de transcripción reversa seguida de reacción de PCR en tiempo real. Se utilizó un termociclador iCycler IQ (Bio-Rad) empleando tecnología TaqMan. Los oligonucleótidos y la sonda se dirigieron a amplificar los nucleótidos 10419 a 10493 en la región 3' NC viral. Cada mezcla de reacción (50 μ l) contenía 5 μ l de la muestra de ARN y concentraciones finales de buffer RT-PCR 1 \times (Tris-HCl 10 mM pH 8.4, KCl 50 mM, gelatina 0,01 % p/v y ditiotretol (DTT) 10 mM), MgCl₂ 2,5 mM, desoxinucleósidos trifosfatos (dNTs) 250 μ M, oligonucleótido 3' (5'-CACTACGCCATGCGTACAGC-3') 100 nM, y 100 unidades de enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega). La reacción de transcripción reversa se realizó durante 30 min. a 37 °C y luego se agregó oligonucleótido 5' (5'-CCTGTAGCTCCACCT-GAGAAG-3') 100nM, sonda (5'-/56-FAM/CCGGGAGGCCACAAACCATGG/36-TAM/-3') 100 nM y 2 unidades de enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen) a cada tubo de reacción. La amplificación y detección por PCR se realizó empleando las siguientes condiciones: 95 °C durante 3 min (1 ciclo) y luego 40 ciclos de 95 °C durante 15 seg. y 61 °C durante 1 min. Se generó una curva estándar empleando ARN de replicones de DENV transcriptos in vitro.

Los mRNAs de las quinasas EPI1B2, CDC42BPA y MAP4K5 se cuantificaron utilizando *Syber green*. Se utilizaron los siguientes pares de oligos, los cuales amplifican fragmentos

de unas 200 pb: EPHB2 (AVG 856, AVG 857), CDC42BPA (AVG 858, AVG 859), MAP4K5 (AVG 854, AVG 855) y Actina β (AVG 860, AVG 861). Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 95 °C durante 5 min (1 ciclo) y luego 40 ciclos de 95 °C 30 seg. , 58 °C 30 seg. y 72°C 30 seg. El análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando el programa de i-Cycler (Bio-Rad).

Experimentos de caza y captura, expresión y detección de las proteínas sE recombinantes

Las partículas SFV-E recombinantes se produjeron por electroporación de los RNAs de los vectores, en células BHK. Las proteínas sE se obtuvieron mediante la infección de células BHK con partículas recombinantes SFV-E (MOI=50). Para los experimentos de caza y captura, las células fueron hambreadas a las 7hs post-infección durante 45 minutos, en medio DMEM libre de suero y metionina/cisteína (ICN Biomedicals) previo al agregado de 200 μ Ci/ml de cisteína [35 S] y metionina [35 S] (Pro-Mix 35S: GE). Los pulsos fueron de 15 y 25 minutos en células BHK y C6/36, respectivamente. Seguido, las células se lavaron y la síntesis de las proteínas sE continuó hasta las 7hs en DMEM libre de suero. Las células se lisaron en buffer A (20 mM Tris [pH, 7.5], 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Tritón X-100, suplementado inhibidores de proteasas). Los sobrenadantes y lisados se clarificaron previo a la inmuno precipitación con el mAb 1D4, y se analizaron por SDS-PAGE. Los geles se fijaron y se secaron, para luego exponerlos a una placa Biomax MR1 (Kodak). Las proteínas marcadas se cuantificaron usando el programa ImageJ. El porcentaje de proteína secretada se calculó de la siguiente manera: % de sE secretada = $100[(RU_{t_0} - sRU_{t_0})/cRU_{t_0} - RU_{bc}]$, donde t_0 es al comienzo de la cinética; RU_{t_0} es la proteína sE secretada a un tiempo determinado tiempo de la cinética; sRU_{t_0} es la proteína sE secretada a t_0 ; cRU_{t_0} es la proteína sE en la célula a t_0 ; y RU_{bc} es el background correspondiente al control negativo (pocillo vacío).

Inmunofluorescencia y microscopía

Las células se fijaron con paraformaldehído 4%, sacarosa 4%, PBS pH 7.4 a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las células se trataron con NH_4Cl 50 mM en PBS durante 10 minutos y luego se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1% durante 4 minutos. Se utilizaron los anticuerpos primarios y secundarios indicados arriba, de acuerdo al experimento realizado. La tinción de *lipid droplets* se realizó incubando a las células con BODIPY 493/503 (4,4-difluoro 1, 3, 5, 7,8 pentamethyl 4-bora 3a, 4a-diaza-s-indacene) (Molecular Probes) durante 5 minutos.

Las fotomicrografías se tomaron en un microscopio Olympus BX-60 acoplado a una cámara digital CoolSnap Pro (Media Cybernetics) y se utilizó una ampliación de 200 veces para la captura de imágenes de células BHK-21 y de 400 veces para C6/36. Para las fotomicrografías confocal, se utilizó el confocal I Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss, Jena, Germany). Las imágenes se analizaron con el programa "LSM Image Browser" incorporado a la plataforma Zeiss.

Para determinar el coeficiente de colocación de *Pearson* se calculó la media de tres planos para cada célula presente en cinco campos distintos. Para esto se utilizó un *software* creado por el Centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, dirigido por la Dra. Lía I. Pietrasanta.

Ensayos de unidades formadoras de placas de lisis

Los stocks de virus se cuantificaron mediante el ensayo de unidades formadoras de placas de lisis (PFU). Para esto se pasaron 3×10^4 - 5×10^4 células BHK-21 por pocillo en una placa de 24 pocillos y se dejaron adherir toda la noche. Las monocapas de células (50 a 70 % de confluencia) se infectaron con 0,1 ml por pocillo de diluciones seriadas al décimo del stock viral en PBS. Se incubó 1 hora a 37 °C, agitando cada 10 minutos, y luego se completó cada pocillo con 1 ml de MEM α semisólido (MEM α 1x, 0,8 % de metilcelulosa, 2% SFB, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin). Las células se crecieron en estufa a 37 °C por 7 a 9 días. Luego se fijaron con formaldehído al 10 % por 45 minutos y finalmente se tiñeron con solución de cristal violeta (0,1 % de cristal violeta en etanol al 20 %).

Curvas de crecimiento viral

Se pasaron células BHK-21 o C6/36 en placas de 6 pocillos y se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 80-90 %. Se utilizaron para la infección los stocks de cuantificados mediante un ensayo de placa de lisis. Las monocapas de células se infectaron con 0,5 ml de una dilución de los stocks virales a una multiplicidad de infección de 0,01 PFU/célula. Luego de 1 hora de incubación, se realizaron tres lavados con PBS y se agregaron 2 ml de medio de crecimiento. Se retiraron 0,2 ml de sobrenadante de infección a los tiempos post-infección indicados y se conservaron las muestras a -70 °C. Para la cuantificación de partículas virales, se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes de infección y se determinó el título en ensayos de PFU.

Tratamiento con glicosidasas

Las células BHK y C6/36 se crecieron en placas de 35 mm y se infectaron con los virus WT o mutantes. Las células se cosecharon, se lavaron con PBS y se lisaron usando un buffer de lisis L (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Tritón X-100, 0.5 mM fenilmetilsulfonil sulfato) a pH 7.5. Los lisados se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min y se desnaturalizaron en buffer S (5% SDS, 50 mM Tris pH 6.8, glicerol 10 %) a 70 °C durante 10 minutos. Alícuotas de cada muestra se trataron con 250 U de PNGasa F, 500 U de EndoH o con buffer control.

Ensayo de radioinmunoprecipitación

Se infectaron monocapas de células BHK, crecidas en microplacas de 24 pocillos, con los virus a una MOI de 1. Luego de 1 h de incubación a 37 ° se agregó medio sin metionina ni cisteína. Luego de 1 h de ayuno a 37 °C, se incorporó la marca radiactiva, mezcla de 35S-metionina y 35S-cisteína (Expre35S35S, 100 µCi/ml, NEN Dupont), y se incubaron las células durante 4 h a 37 °C. Concluido el período de marcación, las células se lavaron tres veces con PBS y se lisaron con 75 µl de buffer RIPA (NaCl 0,15 M, SDS 0,1 %, Tritón X-100 1 %, Deoxicolato de sodio 1 %, Tris-HCl 0,01 M pH 7,4) en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF 0,4 mM y aprotinina 30 µl/ml, Sigma). La suspensión celular se congeló y descongeló tres veces, agregando en cada ciclo de congelado y descongelado inhibidores de proteasas (PMSF 0,4 mM y aprotinina 30 µl/ml). Luego se centrifugó durante 10 min a 13000 x g y el sobrenadante se utilizó como fuente de antígenos virales para su posterior inmunoprecipitación y electroforesis en gel de poliacrilamida. Para la inmunoprecipitación, los sobrenadantes se incubaron con suero de conejo anti-DENV-2/403, en una dilución 1/50, durante 30 min a 37 °C y 90 min a 4 °C. Luego se utilizó como medio de arrastre de los complejos Inmunes, 30 µl de proteína A-seferosa y se dejó incubar durante otros 30 min a 37 °C y 90 min a 4 °C. Se realizaron tres ciclos de lavado con buffer RIPA, se resuspendió el precipitado en buffer para muestra de electroforesis. Las proteínas virales marcadas radiactivamente se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida y se visualizaron por fluorografía.

Citometría de flujo

Un total de 100.000 células se expusieron al virus durante 2 hs a 37 °C en medio RPMI 164 suplementado con 0.2% de BSA y 1% penicilina/esteptomicina. Las células se fijaron y permeabilizadas con buffers citofix y citoperm (Pharmingen). Las células permeabilizadas se incubaron con el anticuerpo mAb 4G2 durante 45 minutos a 4 °C antes de lavar e incubar con el anticuerpo secundario conjugado con fitoeritrina anti ratón mAb (R0480)

durante 35 minutos a 8 °C. Luego, las células se lavaron lavadas y se analizaron con el equipo FACSCalibur, BD Biosciences. Los datos se procesaron con el programa CellQuest (Biosciences). Para los experimentos de unión, las células Vero y BHK (200000 células) se incubaron con números equivalentes de genomas del virus WT y de los mutantes (50 genomas de DENV/células, determinado por PCR en tiempo real) por 2 hrs a 4 °C en medio RPMI suplementado con 1% de BSA y 10 mM HEPES. Las células se lavaron tres veces con PBS frío y se fijaron con 4% de paraformaldehído en PBS durante 30 minutos.

Apéndice

Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Las secuencias se encuentran en sentido 5'-3'.

| Oligo | Secuencia (5'-3') |
|----------|--|
| AVG 0007 | GTGGGTTTCGAAAGTGAGAATCTCTTTGTCAGCT |
| AVG 0101 | TCCAGACTTTACGAAACACG |
| AVG 0239 | TCTGTGATGGAACCTCTGTGG |
| AVG 0241 | TTTGACATTCTATGCAACG |
| AVG 0273 | GAATTCGAGCTCACGGTAAATTTAATACGACTCACTATAAGTTGTTAGTCTACGTGG |
| AVG 0387 | GTTTCATCTTAAGTTTTGCTTTCTATTGTTCATTTTGAGAACTC |
| AVG 0408 | CGACGTCGCATGCAGTCGGACAAGACACAGGAAACATGGC |
| AVG 0410 | GAATACATCCTGTTTTCTTC |
| AVG 0411 | GCGAGATTCTGTTGTTGTTGGGTTAGCTTTGCCTCTAT |
| AVG 0412 | ATAGAGGCAAAGCTAACCCAAACAACAACAGAATCTCGC |
| AVG 0428 | AAGAAGCAGGAGTTCGTGGTAGTAACCCCGGGCCCGGATCCG |
| AVG 0480 | ATATGGCCACAACCATGGTGACCGGTATGACTTCGAAAGTTATG |
| AVG 0481 | CATAAATTTTGAAGTCATACCGGTCACCATGGTTGTGGCCATAT |
| AVG 0516 | GACGTCTCCCGCAAGCTTGAGAAGGTCAAAATTCACAGCTGTTGTTCATTTTGAGAACTCGC |
| AVG 0517 | CTTCTCAAGCTTTCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCCTGGGCAATGAATAACCAACGGAAAAAGGCG |
| AVG 1099 | CAGAGATATCAACGGGTAAGCATGCATCCGCGGCTCGGCCGACATGATCCAGAACAAGG |
| AVG 1100 | CTGATATCTAGGCCCGCCCTGCTAGCCCTTTAAACGGTTTCAATTGTTCATTTTGAGA |
| AVG 1101 | TACCTACAGCATGCTCTTCTCCTGA |
| AVG 1102 | TCAGGAGAAGAGCATGCTGTAGGTA |
| AVG 1103 | TGGCCGCGGACATGAGTTTTGAGTC |
| AVG 1104 | TCATGTCCGCGGCCATTAAGACAACAG |
| AVG 1121 | CAATCGGCCGATCGTCCAGTGAGC |
| AVG 1122 | ACGATCGGCCGATTTGGAAGTAGAGAG |
| AVG 1123 | CTCTGGTTCGAACATACTAGGAATG |
| AVG 1124 | TAGTATGTTTCAACCAGAGCGTG |
| AVG 1125 | AGTGGGTTTAAACGGCTTTTCCATTTTC |
| AVG 1126 | AAGCCGTTTAAACGCACTGGGAAAAAGTG |
| AVG 1127 | CTCTTGCTAGCCAGTTCTGTACAGC |
| AVG 1128 | ACTGGCTAGCAAGAGTGGGGCGTG |
| AVG 1129 | ATCTAGGCGCGCCCTCGAGAGAACCCTGTTGATTCAACAGC |
| AVG 1155 | TCATAAATTTTGAAGTGAGAATCTCTTTGTCAGC |
| AVG 1156 | CTCAAGCTTTCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCCTGGGCAATGAATAACCAACGAAAAAAG |

Referencias bibliográficas

- Acosta, E. G., V. Castilla, et al. (2009). "Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells." *Cell Microbiol* 11(10): 1533-1549.
- Adams, S. C., A. K. Broom, et al. (1995). "Glycosylation and antigenic variation among Kunjin virus isolates." *Virology* 206(1): 49-56.
- Altmeyer, R. (2004). "Virus attachment and entry offer numerous targets for antiviral therapy." *Curr Pharm Des* 10(30): 3701-3712.
- Alvarez, D. E., A. L. De Lella Ezcurra, et al. (2005). "Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication." *Virology* 339(2): 200-212.
- Alvarez, D. E., M. F. Lodeiro, et al. (2005). "Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome." *J Virol* 79(11): 6631-6643.
- Ansarah-Sobrinho, C., S. Nelson, et al. (2008). "Temperature-dependent production of pseudoinfectious dengue reporter virus particles by complementation." *Virology* 381(1): 67-74.
- Assuncao-Miranda, I., F. A. Amaral, et al. (2010). "Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection." *EASEB J* 24(1): 218-228.
- Bandyopadhyay, S., L. C. Lum, et al. (2006). "Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever." *Trop Med Int Health* 11(8): 1238-1255.
- Bartholomeusz, A. I. and P. J. Wright (1993). "Synthesis of dengue virus RNA in vitro: initiation and the involvement of proteins NS3 and NSS." *Arch Virol* 128(1-2): 111-121.
- Bartz, R., J. K. Zehmer, et al. (2007). "Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation." *J Proteome Res* 6(8): 3256-3265.
- Beasley, D. W., M. C. Whiteman, et al. (2005). "Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains." *J Virol* 79(13): 8339-8347.
- Beller, M., C. Szatmari, et al. (2008). "COPI complex is a regulator of lipid homeostasis." *PLoS Biol* 6(11): e292.
- Bickel, P. E., J. T. Tansey, et al. (2009). "PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores." *Biochim Biophys Acta* 1791(6): 419-440.
- Boulant, S., M. W. Douglas, et al. (2008). "Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner." *Traffic* 9(8): 1268-1282.
- Boulant, S., P. Targett-Adams, et al. (2007). "Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus." *J Gen Virol* 88(Pt 8): 2204-2213.
- Brasaemle, D. L., T. Barber, et al. (1997). "Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein." *J Lipid Res* 38(11): 2249-2263.
- Bryant, J. E., A. E. Calvert, et al. (2007). "Glycosylation of the dengue 2 virus E protein at N67 is critical for virus growth in vitro but not for growth in intrathoracically inoculated *Aedes aegypti* mosquitoes." *Virology* 366(2): 415-423.
- Butrapet, S., C. Y. Huang, et al. (2000). "Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3." *J Virol* 74(7): 3011-3019.
- Ceballos-Olvera, I., S. Chavez-Salinas, et al. (2010). "JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol." *Virology* 396(1): 30-36.
- Clyde, K., J. L. Kyle, et al. (2006). "Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis." *J Virol* 80(23): 11418-11431.
- Courageot, M. P., M. P. Frenkiel, et al. (2000). "Alpha-glucosidase inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial steps of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum." *J Virol* 74(1): 564-572.
- Coyne, C. B. and S. Cherry (2011). "RNAi Screening in Mammalian Cells to Identify Novel Host Cell Molecules Involved in the Regulation of Viral Infections." *Methods Mol Biol* 721: 397-405.

- Crabtree, M. B., R. M. Kinney, et al. (2005). "Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses." *Arch Virol* 150(4): 771-786.
- Chambers, T. J., C. S. Hahn, et al. (1990). "Flavivirus genome organization, expression, and replication." *Annu Rev Microbiol* 44: 649-688.
- Chang, B. H., L. Li, et al. (2006). "Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein." *Mol Cell Biol* 26(3): 1063-1076.
- Chen, L. C., H. Y. Lei, et al. (2006). "Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients." *Am J Trop Med Hyg* 74(1): 142-147.
- Chen, Y., T. Maguire, et al. (1997). "Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate." *Nat Med* 3(8): 866-871.
- Christie, J. (1872). "Remarks on 'Kidinga Pepo': A Peculiar Form of Exanthematous Disease." *Br Med J* 1(596): 577-579.
- Chu, J. J. and P. L. Yang (2007). "c-Src protein kinase inhibitors block assembly and maturation of dengue virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9): 3520-3525.
- Davis, C. W., L. M. Mattei, et al. (2006). "The Location of Asparagine-linked Glycans on West Nile Virions Controls Their Interactions with CD209 (Dendritic Cell-specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin)." *J Biol Chem* 281(48): 37183-37194.
- Davis, C. W., H. Y. Nguyen, et al. (2006). "West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection." *J Virol* 80(3): 1290-1301.
- Deas, T. S., I. Binduga-Gajewska, et al. (2005). "Inhibition of flavivirus infections by antisense oligomers specifically suppressing viral translation and RNA replication." *J Virol* 79(8): 4599-4609.
- Durbin, A. P., S. S. Whitehead, et al. (2005). "rDEN4delta30, a live attenuated dengue virus type 4 vaccine candidate, is safe, immunogenic, and highly infectious in healthy adult volunteers." *J Infect Dis* 191(5): 710-718.
- Egloff, M. P., D. Benarroch, et al. (2002). "An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization." *Embo J* 21(11): 2757-2768.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, et al. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* 411(6836): 494-498.
- Eldrup, A. B., C. R. Allerson, et al. (2004). "Structure-activity relationship of purine ribonucleosides for inhibition of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase." *J Med Chem* 47(9): 2283-2295.
- Falgout, B., M. Bray, et al. (1990). "Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis." *J Virol* 64(9): 4356-4363.
- Falgout, B., M. Pethel, et al. (1991). "Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins." *J Virol* 65(5): 2467-2475.
- Filomatorí, C. V., M. F. Lodeiro, et al. (2006). "A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome." *Genes Dev* 20(16): 2238-2249.
- Gascuel, O. (1997). "BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data." *Mol Biol Evol* 14(7): 685-695.
- Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, et al. (1989). "Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes." *Nucleic Acids Res* 17(12): 4713-4730.
- Goto, A., K. Yoshii, et al. (2005). "Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion." *Vaccine* 23(23): 3043-3052.
- Gualano, R. C., M. J. Pryor, et al. (1998). "Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA." *J Gen Virol* 79 (Pt 3): 437-446.
- Gubler, D. J. (2006). "Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status." *Novartis Found Symp* 277: 3-16; discussion 16-22, 71-13, 251-253.
- Gulakhov, F., A. R. Hunt, et al. (1993). "Selection and partial characterization of dengue 2 virus mutants that induce fusion at elevated pH." *Virology* 194(1): 219-223.
- Gunther, J., I. P. Martinez-Munoz, et al. (2007). "Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico." *Intervirology* 50(5): 347-352.


- Guy, B. and J. W. Almond (2008). "Towards a dengue vaccine: progress to date and remaining challenges." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31(2-3): 239-252.
- Guzman, M. G., S. B. Halstead, et al. (2010). "Dengue: a continuing global threat." *Nat Rev Microbiol* 8(12 Suppl): S7-S16.
- Hacker, K., L. White, et al. (2009). "N-linked glycans on dengue viruses grown in mammalian and insect cells." *J Gen Virol* 90(Pt 9): 2097-2106.
- Halstead, S. B., Ed. (2008). *Dengue*.
- Hanna, S. L., T. C. Pierson, et al. (2005). "N-linked glycosylation of west nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity." *J Virol* 79(21): 13262-13274.
- Heaton, N. S., R. Perera, et al. (2010). "Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis." *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 107(40): 17345-17350.
- Heaton, N. S. and G. Randall (2010). "Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism." *Cell Host Microbe* 8(5): 422-432.
- Hebert, D. N., B. Foellmer, et al. (1996). "Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes." *EMBO J* 15(12): 2961-2968.
- Heid, H. W., R. Moll, et al. (1998). "Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases." *Cell Tissue Res* 294(2): 309-321.
- Heinz, F. and S. Allison (2003). *Flavivirus Structure and Membrane Fusion. In: Flaviviruses. Adv Virus Res* 63:97.
- Heinz, F. X. and S. L. Allison (2003). "Flavivirus structure and membrane fusion." *Adv Virus Res* 59: 63-97.
- Hirsch, A. J., G. R. Medigeshi, et al. (2005). "The Src family kinase c-Yes is required for maturation of West Nile virus particles." *J Virol* 79(18): 11943-11951.
- Huang, C. Y., S. Butrapet, et al. (2003). "Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development." *J Virol* 77(21): 11436-11447.
- Hung, S. L., P. L. Lee, et al. (1999). "Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells." *Virology* 257(1): 156-167.
- Imamura, M., T. Inoguchi, et al. (2002). "ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(4): E775-783.
- Irie, F., M. Okuno, et al. (2005). "EphrinB-EphB signalling regulates clathrin-mediated endocytosis through tyrosine phosphorylation of synaptojanin 1." *Nat Cell Biol* 7(5): 501-509.
- Jansen, C. C. and N. W. Beebe (2010). "The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next." *Microbes Infect* 12(4): 272-279.
- Jindadamrongwech, S., C. Thepparit, et al. (2004). "Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2." *Arch Virol* 149(5): 915-927.
- Johnson, A. J., F. Gulrakho, et al. (1994). "The envelope glycoproteins of dengue 1 and dengue 2 viruses grown in mosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites." *Virology* 203(2): 241-249.
- Johnson, A. J. and J. T. Roehrig (1999). "New mouse model for dengue virus vaccine testing." *J Virol* 73(1): 783-786.
- Jones, M., A. Davidson, et al. (2005). "Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression." *J Virol* 79(9): 5414-5420.
- Kapoor, M., L. Zhang, et al. (1995). "Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replkase is linked to differential phosphorylation of NS5." *J Biol Chem* 270(32): 19100-19106.
- Khromykh, A. A., M. T. Kenney, et al. (1998). "trans-Complementation of flavivirus RNA polymerase gene NS5 by using Kunjin virus replicon-expressing BHK cells." *J Virol* 72(9): 7270-7279.
- Khromykh, A. A., H. Meka, et al. (2001). "Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication." *J Virol* 75(14): 6719-6728.
- Kim, J. M., S. I. Yun, et al. (2008). "A single N-linked glycosylation site in the Japanese encephalitis virus prM protein is critical for cell type-specific prM protein biogenesis, virus particle release, and pathogenicity in mice." *J Virol* 82(16): 7846-7862.
- Kinney, R. M., S. Butrapet, et al. (1997). "Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53." *Virology* 230(2): 300-308.

- Kouri, G., M. G. Guzman, et al. (1986). "Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic." *Bull Pan Am Health Organ* 20(1): 24-30.
- Krishnan, M. N., A. Ng, et al. (2008). "RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection." *Nature* 455(7210): 242-245.
- Kroeger, A., M. Nathan, et al. (2004). "Dengue." *Nat Rev Microbiol* 2(5): 360-361.
- Kuhn, R. J., W. Zhang, et al. (2002). "Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion." *Cell* 108(5): 717-725.
- Kummerer, B. M. and C. M. Rice (2002). "Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles." *J Virol* 76(10): 4773-4784.
- Kurane, I., B. L. Innis, et al. (1993). "High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection." *Am J Trop Med Hyg* 48(2): 222-229.
- Kyriakis, J. M. (1999). "Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases." *J Biol Chem* 274(9): 5259-5262.
- Lai, C. Y., H. P. Hu, et al. (2008). "Incorporation of dengue virus replicon into virus-like particles by a cell line stably expressing precursor membrane and envelope proteins of dengue virus type 2." *J Biomed Sci* 15(1): 15-27.
- Lanciotti, R. S., J. T. Roehrig, et al. (1999). "Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States." *Science* 286(5448): 2333-2337.
- Lee, E., S. K. Leang, et al. (2010). "Both E protein glycans adversely affect dengue virus infectivity but are beneficial for virion release." *J Virol* 84(10): 5171-5180.
- Lee, E., R. C. Weir, et al. (1997). "Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein." *Virology* 232(2): 281-290.
- Lee, E., P. J. Wright, et al. (2006). "Virulence attenuation of Dengue virus due to augmented glycosaminoglycan-binding affinity and restriction in extraneural dissemination." *J Gen Virol* 87(Pt 10): 2791-2801.
- Liljestrom, P. and H. Garoff (1991). "A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon." *Biotechnology (NY)* 9(12): 1356-1361.
- Limjindaporn, T., W. Wongwiwat, et al. (2009). "Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production." *Biochem Biophys Res Commun* 379(2): 196-200.
- Lindenbach, B. T. II, and Rice, CM. (2007). *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott-Raven.
- Listenberger, L. L., A. G. Ostermeyer-Fay, et al. (2007). "Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover." *J Lipid Res* 48(12): 2751-2761.
- Londos, C., D. L. Brasaemle, et al. (1995). "Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells." *Biochem Soc Trans* 23(3): 611-615.
- Lorenz, I. C., J. Kartenbeck, et al. (2003). "Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus." *J Virol* 77(7): 4370-4382.
- Lozach, P. Y., A. Amara, et al. (2004). "C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles." *J Biol Chem* 279(31): 32035-32045.
- Lozach, P. Y., L. Burleigh, et al. (2005). "Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals." *J Biol Chem* 280(25): 23698-23708.
- Ma, L., C. T. Jones, et al. (2004). "Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10): 3414-3419.
- Mackenzie, J. M., M. K. Jones, et al. (1996). "Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication." *Virology* 220(1): 232-240.
- Mackenzie, J. M., A. A. Khromykh, et al. (1998). "Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A." *Virology* 245(2): 203-215.
- Malavige, G. N., S. Fernando, et al. (2004). "Dengue viral infections." *Postgrad Med J* 80(948): 588-601.
- Markoff, L. (2003). *5' and 3' NCRs in Flavivirus RNA*. Elsevier Academic Press.
- Martinez-Barragan, J. J. and R. M. del Angel (2001). "Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection." *J Virol* 75(17): 7818-7827.


- Masuh, H. (2008). "Re-emergence of dengue in Argentina: Historical development and future challenges." *Dengue Bulletin (World Health Organization) Volume 32*.
- Messer, W. B., D. J. Gubler, et al. (2003). "Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus." *Emerg Infect Dis* 9(7): 800-809.
- Miller, J. L., B. J. de Wet, et al. (2008). "The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages." *PLoS Pathog* 4(2): e17.
- Miller, S., S. Kastner, et al. (2007). "The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner." *J Biol Chem* 282(12): 8873-8882.
- Modis, Y., S. Ogata, et al. (2003). "A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12): 6986-6991.
- Modis, Y., S. Ogata, et al. (2004). "Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion." *Nature* 427(6972): 313-319.
- Mukhopadhyay, S., B. S. Kim, et al. (2003). "Structure of West Nile virus." *Science* 302(5643): 248.
- Mukhopadhyay, S., R. J. Kuhn, et al. (2005). "A structural perspective of the flavivirus life cycle." *Nat Rev Microbiol* 3(1): 13-22.
- Munoz-Jordan, J. L., M. Laurent-Rolle, et al. (2005). "Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses." *J Virol* 79(13): 8004-8013.
- Munoz-Jordan, J. L., G. G. Sanchez-Burgos, et al. (2003). "Inhibition of interferon signaling by dengue virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 14333-14338.
- Murrell, S., S. C. Wu, et al. (2011). "Review of dengue virus and the development of a vaccine." *Biotechnol Adv* 29(2): 239-247.
- Nación, M. d. S. d. L. (2010). *Situación del dengue en argentina. Primer semestre del 2009*, Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación.
- Nakamura, N., T. Akashi, et al. (2004). "ADRP is dissociated from lipid droplets by ARF1-dependent mechanism." *Biochem Biophys Res Commun* 322(3): 957-965.
- Navarro-Sanchez, E., R. Altmeyer, et al. (2003). "Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses." *EMBO Rep* 4(7): 723-728.
- Ng, C. Y., F. Gu, et al. (2007). "Construction and characterization of a stable subgenomic dengue virus type 2 replicon system for antiviral compound and siRNA testing." *Antiviral Res* 76(3): 222-231.
- Niu, T. K., A. C. Pfeifer, et al. (2005). "Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi." *Mol Biol Cell* 16(3): 1213-1222.
- OPS (2008). Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas, Organización Panamericana de la Salud.
- OPS (2009). Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) in the Americas, Organización Panamericana de la Salud.
- Parodi, A. J. (2000). "Protein glycosylation and its role in protein folding." *Annu Rev Biochem* 69: 69-93.
- Pasquale, E. B. (2005). "Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(6): 462-475.
- Peng, X., E. Y. Chan, et al. (2009). "Virus-host interactions: from systems biology to translational research." *Curr Opin Microbiol* 12(4): 432-438.
- Pierson, T. C., M. S. Diamond, et al. (2005). "An infectious West Nile virus that expresses a GFP reporter gene." *Virology* 334(1): 28-40.
- Pokidysheva, E., Y. Zhang, et al. (2006). "Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN." *Cell* 124(3): 485-493.
- Pryor, M. J., S. M. Rawlinson, et al. (2007). "Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin alpha/beta-recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection." *Traffic* 8(7): 795-807.
- Puig-Basagoiti, F., T. S. Deas, et al. (2005). "High-throughput assays using a luciferase-expressing replicon, virus-like particles, and full-length virus for West Nile virus drug discovery." *Antimicrob Agents Chemother* 49(12): 4980-4988.
- Puig-Basagoiti, F., M. Tilgner, et al. (2006). "Triaryl pyrazoline compound inhibits flavivirus RNA replication." *Antimicrob Agents Chemother* 50(4): 1320-1329.
- Puri, B., S. Polo, et al. (2000). "Construction of a full length infectious clone for dengue-1 virus Western Pacific, 74 strain." *Virus Genes* 20(1): 57-63.

- Qing, M., W. Liu, et al. (2010). "A high-throughput assay using dengue-1 virus-like particles for drug discovery." *Antiviral Res* 86(2): 163-171.
- Radtke, K., K. Dohner, et al. (2006). "Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell." *Cell Microbiol* 8(3): 387-400.
- Raviprakash, K., G. Defang, et al. (2009). "Advances in dengue vaccine development." *Hum Vaccin* 5(8): 520-528.
- Rey, F. A., F. X. Heinz, et al. (1995). "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution." *Nature* 375(6529): 291-298.
- Rico-Ilesse, R., L. M. Harrison, et al. (1997). "Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas." *Virology* 230(2): 244-251.
- Riento, K. and A. J. Ridley (2003). "Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(6): 446-456.
- Rodenhuis-Zybert, I. A., H. M. van der Schaar, et al. (2010). "Immature dengue virus: a veiled pathogen?" *PLoS Pathog* 6(1): e1000718.
- Rodenhuis-Zybert, I. A., J. Wilschut, et al. (2010). "Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity." *Cell Mol Life Sci* 67(16): 2773-2786.
- Salas-Benito, J. S. and R. M. del Angel (1997). "Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus." *J Virol* 71(10): 7246-7252.
- Samsa, M. M., J. A. Mondotte, et al. (2009). "Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation." *PLoS Pathog* 5(10): e1000632.
- Sessions, O. M., N. J. Barrows, et al. (2009). "Discovery of insect and human dengue virus host factors." *Nature* 458(7241): 1047-1050.
- Shafee, N. and S. AbuBakar (2003). "Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis." *J Gen Virol* 84(Pt 8): 2191-2195.
- Shizuya, H., B. Birren, et al. (1992). "Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(18): 8794-8797.
- Soni, K. G., G. A. Mardones, et al. (2009). "Coatmer-dependent protein delivery to lipid droplets." *J Cell Sci* 122(Pt 11): 1834-1841.
- Sreenivasan, V., K. L. Ng, et al. (1993). "Brefeldin A affects West Nile virus replication in Vero cells but not C6/36 cells." *J Virol Methods* 45(1): 1-17.
- Stadler, K., S. L. Allison, et al. (1997). "Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin." *J Virol* 71(11): 8475-8481.
- Suzuki, R., L. de Borja, et al. (2007). "Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1." *Virology* 362(2): 374-383.
- Tassaneeritthep, B., T. H. Burgess, et al. (2003). "DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells." *J Exp Med* 197(7): 823-829.
- Tauchi-Sato, K., S. Ozeki, et al. (2002). "The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition." *J Biol Chem* 277(46): 44507-44512.
- Thepparit, C. and D. R. Smith (2004). "Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor." *J Virol* 78(22): 12647-12656.
- Tomiya, N., S. Narang, et al. (2004). "Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines." *Glycoconj J* 21(6): 343-360.
- van der Schaar, H. M., M. J. Rust, et al. (2008). "Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells." *PLoS Pathog* 4(12): e1000244.
- van Gorp, E. C., C. Suharti, et al. (2002). "Changes in the plasma lipid profile as a potential predictor of clinical outcome in dengue hemorrhagic fever." *Clin Infect Dis* 34(8): 1150-1153.
- Villar-Centeno, L. A., F. A. Diaz-Quijano, et al. (2008). "Biochemical alterations as markers of dengue hemorrhagic fever." *Am J Trop Med Hyg* 78(3): 370-374.
- Villordo, S. M., D. E. Alvarez, et al. (2010). "A balance between circular and linear forms of the dengue virus genome is crucial for viral replication." *RNA*.
- Villordo, S. M. and A. V. Gamarnik (2009). "Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication." *Virus Res* 139(2): 230-239.
- Wang, J. L., J. L. Zhang, et al. (2010). "Roles of small GTPase Rac1 in the regulation of actin cytoskeleton during dengue virus infection." *PLoS Negl Trop Dis* 4(8).

- Weaver, S. C. and N. Vasilakis (2009). "Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease." *Infect Genet Evol* 9(4): 523-540.
- Welsch, S., S. Miller, et al. (2009). "Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites." *Cell Host Microbe* 5(4): 365-375.
- Wengler, G. (1989). "Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E-pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release." *J Virol* 63(6): 2521-2526.
- Whitby, K., T. C. Pierson, et al. (2005). "Castanospermine, a potent inhibitor of dengue virus infection in vitro and in vivo." *J Virol* 79(14): 8698-8706.
- WHO (1997). Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization.
- WHO (2009). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization.
- Wilder-Smith, A., E. E. Ooi, et al. (2010). "Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development." *Curr Infect Dis Rep* 12(3): 157-164.
- Wolins, N. E., D. L. Brasaemle, et al. (2006). "A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins." *FEBS Lett* 580(23): 5484-5491.
- Wolins, N. E., B. Rubin, et al. (2001). "TIP47 associates with lipid droplets." *J Biol Chem* 276(7): 5101-5108.
- Woolaway, K. E., K. Lazaridis, et al. (2001). "The 5' untranslated region of *Rhopalosiphum padi* virus contains an internal ribosome entry site which functions efficiently in mammalian, plant, and insect translation systems." *J Virol* 75(21): 10244-10249.
- Wu, S. I., G. Grouard-Vogel, et al. (2000). "Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection." *Nat Med* 6(7): 816-820.
- Xu, G., C. Szalay, et al. (2005). "Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway." *J Biol Chem* 280(52): 42841-42847.
- Yu, I. M., H. A. Holdaway, et al. (2009). "Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion." *J Virol* 83(23): 12101-12107.
- Yun, S. I., S. Y. Kim, et al. (2003). "Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus." *J Virol* 77(11): 6450-6465.
- Zamudio-Meza, H., A. Castillo-Alvarez, et al. (2009). "Cross-talk between Rac1 and Cdc42 GTPases regulates formation of filopodia required for dengue virus type-2 entry into HMEC-1 cells." *J Gen Virol* 90(Pt 12): 2902-2911.
- Zhang, Y., J. Corver, et al. (2003). "Structures of immature flavivirus particles." *EMBO J* 22(11): 2604-2613.
- Zheng, A., M. Umashankar, et al. (2010). "In vitro and in vivo studies identify important features of dengue virus pr-E protein interactions." *PLoS Pathog* 6(10): e1001157.



Andres Garsnik



Juan A. Martínez