

Tesis Doctoral

Estudios sobre los mecanismos de desnudamiento y encapsidación del virus del dengue

Byk, Laura Andrea

2016-12-07

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:

Byk, Laura Andrea. (2016-12-07). Estudios sobre los mecanismos de desnudamiento y encapsidación del virus del dengue. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Byk, Laura Andrea. "Estudios sobre los mecanismos de desnudamiento y encapsidación del virus del dengue". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-12-07.

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

**Estudios sobre los Mecanismos de Desnudamiento y Encapsidación del Virus del
Dengue**

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

Laura Andrea Byk

Directora de Tesis
Dra. Andrea V. Gamarnik

Consejero de estudios
Dr. Luis Scolaro

Lugar de Trabajo
Fundación Instituto Leloir-IIBA-CONICET
Ciudad de Buenos Aires, Argentina

Buenos Aires, 2016

RESUMEN**Desnudamiento y Encapsidación del Virus del Dengue**

El virus del dengue es un importante y creciente problema de salud pública en todo el mundo, dejando a aproximadamente la mitad de la población mundial en riesgo de infección. En la actualidad no se encuentran disponibles antivirales ni vacunas efectivas. En esta tesis se estudiaron los procesos de encapsidación y desnudamiento del virus del dengue, con el foco puesto en la proteína de cápside. Se identificaron requerimientos de residuos básicos en la zona de la $\alpha 4$ de cápside, detallando la necesidad de una densidad de carga positiva en la zona, así como también residuos básicos en posiciones puntuales. Esto permitió proponer un modelo en el cual tanto la región N-terminal desestructurada como la zona C-terminal contribuirían al compactado del genoma viral. Por otro lado, se identificaron por primera vez PTMs en la proteína de cápside de dengue. La presencia de distinto tipo de modificaciones en cápside aislada de células o partículas virales podría indicar una selección de la proteína que se encapsida. Por último, se estudió el mecanismo de desnudamiento de dengue y se demostró que la liberación al citoplasma del genoma que entra dentro de la partícula viral depende de la maquinaria de ubiquitinación, pero no de la actividad del proteasoma, poniendo en evidencia un paso vulnerable para el desarrollo de estrategias antivirales.

Palabras clave: Dengue, Flavivirus, Cápside, Desnudamiento, Encapsidación, Interacción Virus-Célula

ABSTRACT**Dengue Virus Encapsidation and Uncoating**

Dengue virus is a major and growing public health problem worldwide, leaving about half of the world's population at risk of infection. At present there are no effective antivirals or vaccines available. In this work, dengue virus encapsidation and uncoating processes were studied, with the focus on capsid protein. The requirements of basic residues in the $\alpha 4$ region of capsid were investigated, detailing the need for a positive charge density in the area, as well as basic residues in specific positions. This allowed us to elaborate a model in which both the unstructured N-terminal as well as the C-terminal region would contribute to viral genome compaction. Furthermore, post-translational modifications in DENV capsid protein were identified for the first time. The presence of different types of modifications in capsid isolated from cells or viral particles could indicate a selection of the protein that is encapsidated. Finally, dengue virus uncoating was regarded. We found that ubiquitination, but not proteasome activity, is crucial for dengue RNA release into the cytoplasm from incoming virions, highlighting a vulnerable step for the development of antivirals.

Keywords: Dengue, Flavivirus, Capsid, Uncoating, Encapsidation, Virus-Host Interaction

Los resultados presentados en los Capítulos 1 y 2 de esta tesis están siendo preparados para su próxima publicación.

Los resultados presentados en el Capítulo 3 de esta tesis han sido publicados en el siguiente artículo:

Byk LA, Iglesias NG, De Maio FA, Gebhard LG, Rossi M, Gamarnik AV. Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination. MBio. 2016 Jun 28; doi: 10.1128/mBio.00804-16.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada gracias al trabajo y apoyo de mucha gente, que contribuyeron directa o indirectamente para que saliera adelante. Gracias a todos ellos.

A Andrea Gamarnik, mi directora, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por enseñarme y transmitirme su pasión, dedicación y entusiasmo por la ciencia. Gracias, sobre todo, por confiar en mí y hacerme sentir valorada.

A mis compañeros del 202, un laboratorio con un espíritu solidario único, siempre dispuestos a ayudar. Gracias por todas las pequeñas cosas de todos los días que hicieron que trabajar en el laboratorio fuese mejor y más divertido. A Pocho por ayudarme muchísimo en mis comienzos en el laboratorio, tuve mucha suerte en tenerte como guía; a Leopoldo, por su ayuda constante, realmente sos un gran compañero, a Claudia y Luana por su amistad, a Carba por su alegría contagiosa, a Fede por su compañerismo, a Gabriel por su ayuda y sugerencias, a Sergio por su optimismo y sugerencias siempre ocurrentes. A los más jóvenes del laboratorio, Guada y Hora, que llegaron y nos refrescaron los días con sus ocurrencias y buen humor. A Juan Mondotte, Zek, Euge y Mora.

A mi Comité de Seguimiento de Tesis, conformado por Vanesa Gottifredi, Nora López, Mario Rossi y Fernando Goldbaum, por sus sugerencias tanto científicas como personales y por estimular mi crecimiento y aprendizaje durante más de 5 años.

A la Fundación Instituto Leloir, un ambiente de trabajo único con gente excepcional.

A Rosario Duran, Madelón Portela y Analía Lima de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo, por su ayuda con los experimentos de MALDI y su calidez humana.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires, al CONICET y a los organismos de financiación del Laboratorio de Virología Molecular, Agencia de promoción Científica y Tecnológica, DARPA y NIH.

A mis amigos del 201, 203i, 308 y 304, en particular a Sabri, Abel, Male, Jime y el Ruso por hacer de mi lugar de trabajo un ambiente aún mejor.

A Bele Y Dani por las charlas, películas, música, comics, caminatas y más charlas. Soy muy afortunada por haberme cruzado con ustedes.

A Edu, por iniciarme en el ámbito de la investigación aún siendo estudiante y enseñarme a trabajar en un laboratorio. A Silvi, Lu, Juli, Marie, Flor y Dani. A mis amigos de la facultad: Sol, Lu, Charly, Ceco, Let, Gi, Cante, Cagno, Nico, Maru, Javi, Cespel, Sil, Juan y Funes. A mis amigas de siempre, Pame, Elch, Sol, Verito, Flor, Gabyot y Maru. A mis maestros, Paula y Pablo.

A mi familia, por apoyarme siempre. A mis abuelas Elke y Sara por su amor infinito, por el cariño que siempre me transmiten.

A mis hermanos, Alejandro y Karen, por estar siempre. A Vicky, por hacer que todo parezca más fácil. A Dan, por despertarme sentimientos que me eran desconocidos.

A mis papás, Silvia y Rubén, por ser mi ejemplo de vida y estimularme a ser mejor siempre.

A Hernán, el mejor compañero de vida que podría haber soñado, por ayudarme a ser feliz cada día.

	Página
ABREVIATURAS	10
INTRODUCCIÓN	12
Epidemiología y filogenia del virus del dengue	12
Ciclo de transmisión del virus	16
Manifestaciones clínicas y respuesta inmune	18
Diagnóstico	20
Prevención	21
Antivirales	22
La partícula viral	23
El genoma viral	25
Unión y entrada de DENV a la célula hospedadora	27
Ciclo de replicación viral	29
La proteína de cápside	33
OBJETIVOS	38
RESULTADOS	39
CAPÍTULO 1. Identificar determinantes en la proteína de cápside para la formación de partículas virales	39
Estudio de residuos básicos de cápside necesarios para la producción de partículas infectivas en células de mamífero	39
Contribución individual de los aminoácidos básicos de la región $\alpha 4$ de cápside en la propagación viral en células de mamífero	42
Procesamiento de las mutantes de la proteína de cápside	46
Localización subcelular de las mutantes de la proteína de cápside	46
Estudio sobre el requerimiento de residuos básicos de cápside necesarios para la producción de partículas infectivas en células de mosquito	48
Caracterización de la mutante K73A	53

DISCUSIÓN CAPÍTULO 1	57
CAPÍTULO 2. Estudiar propiedades bioquímicas de la proteína de cápside por medio de espectrometría de masa	61
Purificación de la proteína de cápside de DENV	61
Estudio de la existencia de modificaciones post-traduccionales en cápside aislada de virus producidos en células de mosquito	62
Estudio de la existencia de PTMs en cápside aislada de fracciones citoplasmáticas de células de mosquito y mamífero infectadas	64
Estudio de la existencia de PTMs en cápside aislada de virus producidos en células de mamífero y en fracciones nucleares de células de mosquito y mamífero infectadas	65
Relevancia funcional de los residuos de cápside modificados post-traduccionalmente	66
DISCUSIÓN CAPÍTULO 2	69
CAPÍTULO 3. Estudiar el proceso de desnudamiento del genoma del DENV	72
Detección de la proteína de cápside que entra a la célula en la partícula viral	73
Estudio de la degradación de la proteína de cápside que entra a la célula en la partícula viral	76
Análisis del requerimiento de la maquinaria de ubiquitinación celular durante el desnudamiento viral	78
Análisis del requerimiento de proteínas de la familia Cullin-RING E3 ligasas durante el desnudamiento viral	84
Análisis de cápside como posible blanco de ubiquitinación	85
Importancia de la ubiquitinación para la liberación del genoma viral durante la infección	90
DISCUSIÓN CAPÍTULO 3	92
CONCLUSIONES FINALES	95

MATERIALES Y MÉTODOS	99
Clon infeccioso del DENV y DV-R	99
Construcción de virus mutantes	99
Obtención de ARN genómico viral	101
Líneas Celulares	102
Transfección de ARN genómico viral	102
Ensayos de inmunofluorescencia	103
Microscopía	104
Stocks virales	104
Cuantificación de partículas virales infectivas mediante UFP	104
Ensayos de PCR en tiempo real	105
Medición de la actividad de luciferasa de renilla en extractos celulares	105
Fraccionamientos subcelulares	106
Purificación de la proteína C	106
Dot Blot y Slot Blot	107
Mediciones MALDI	107
Western Blots	107
Ensayos de interferencia con ARNi	108
Tratamiento con Proteinasa K	109
Ensayos de inhibición	109
ANEXOS	110
REFERENCIAS	114

ABREVIATURAS

3'SL	3' stem loop
cADN	ADN copia
ADE	Amplificación dependiente de anticuerpos
CAE	Elemento que actúa en <i>cis</i>
CHX	Cicloheximida
CM	Convolutated membranes
CS	Secuencia conservada
DC	Células dendríticas
DENV	Virus del dengue
DHF	Fiebre hemorrágica por dengue
DSS	Shock por dengue
DV-R	Virus reportero
ER	Retículo endoplásmico
hpt	Horas post transfección
hpi	Horas post infección
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
ISF	Virus específicos de insectos
Kb	kilobases
LD	Lipid droplets
mARN	ARN mensajero
MBF	Virus transmitidos por mosquitos
NCR	Región no codificante
nt	Nucleótidos
NKV	Virus con vector desconocido
NLS	Señal de localización nuclear
NS	Proteínas no estructurales
ORF	Marco de lectura abierto

PKC	Proteína kinasa C
PTM	Modificación post-traducciona
RdRp	Polimerasa de ARN dependiente de ARN
siARN	ARN pequeño de interferencia (small interfering RNA)
SLA	Stem loop A
sfRNAs	ARNs subgenómicos
SN	Sobrenadantes
SVP	Partículas subvirales
TBF	Virus transmitidos por garrapatas
UTR	Región no traducible
VP	Vesicle packets
WNV	Virus del Nilo Occidental

INTRODUCCIÓN

Epidemiología y filogenia del virus del dengue

El virus del dengue es el principal patógeno humano transmitido por mosquitos. En los últimos 50 años la incidencia ha aumentado alrededor de 30 veces. Geográficamente, el virus hoy se encuentra en países antiguamente libres del mismo, y tiene presencia tanto en áreas urbanas como rurales. Cerca de 3600 millones de personas, la mitad de la población mundial, viven actualmente en áreas de riesgo (Figura 1). Se estima que cada año hay más de 390 millones de infecciones y 100 millones de casos sintomáticos de dengue (Bhatt et al., 2013).



Figura 1. Países/áreas en riesgo de transmisión, 2008 (WHO, 2009)

La familia *Flaviviridae* está dividida en cuatro géneros: *Pestivirus*, *Pegivirus*, *Hepacivirus* y *Flavivirus*, perteneciendo el dengue a este último (Lindenbach et al., 2007) (Figura 2 y Figura 3). Los miembros de la familia *Flaviviridae* comparten similitudes en la morfología de la partícula viral, la organización del genoma y la estrategia de replicación; sin embargo miembros de distintos géneros no presentan reactividad serológica cruzada, entre otras propiedades biológicas.

Con respecto al género *Flavivirus*, el mismo está compuesto por más de 70 virus, muchos de los cuales son importantes patógenos humanos. Los mismos producen una amplia variedad de enfermedades, como fiebre, encefalitis y fiebre hemorrágica. A pesar de que varios miembros generan preocupación a nivel mundial, como el virus del dengue (DENV), el virus Zika (ZIKV), el virus del Nilo occidental (WNV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus de la fiebre amarilla (YFV) y el virus de la encefalitis por garrapatas (TBEV), sólo se encuentran disponibles vacunas para un número muy reducido de flavivirus.

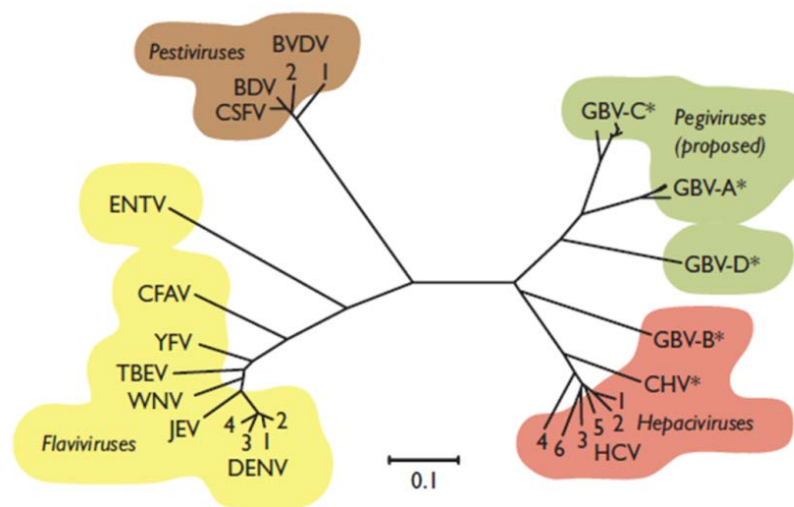


Figura 2. Relación filogenética del género *Flavivirus* y la familia *Flaviviridae* (Adaptado de Lindenbach et al., 2013).

Los virus del género *Flavivirus* son generalmente transmitidos por artrópodos y pueden ser clasificados según el vector responsable de su transmisión de la siguiente manera (Gaunt et al., 2001):

- i. Virus transmitidos por mosquitos (MBF)
- ii. Virus transmitidos por garrapatas (TBF)
- iii. Virus con vector desconocido (NKV)
- iv. Virus específicos de insectos (ISF)

A su vez, los MBF pueden dividirse según su epidemiología en:

- Virus neurotrópicos: asociados con encefalitis, transmitidos generalmente por mosquitos del género *Culex*.
- Virus no neurotrópicos: asociados con enfermedades hemorrágicas, transmitidos generalmente por mosquitos del género *Aedes*.

El DENV se encuentra dentro de los MBF y es transmitido a humanos principalmente por mosquitos *Aedes aegypti*. Si bien ensayos de neutralización indican la existencia de 4 serotipos de dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4), el análisis de secuencias de ARN de DENV reveló que dentro de cada uno de los 4 serotipos existen múltiples genotipos, agrupados en base a su similitud nucleotídica (Rico-Hesse et al., 1997).

Se cree que la evolución, los patrones de dispersión y las características epidemiológicas de DENV (y otros flavivirus) están determinados por una combinación de restricciones impuestas por el artrópodo vector, el hospedador vertebrado, la ecología asociada y la movilidad y actividad comercial humana.

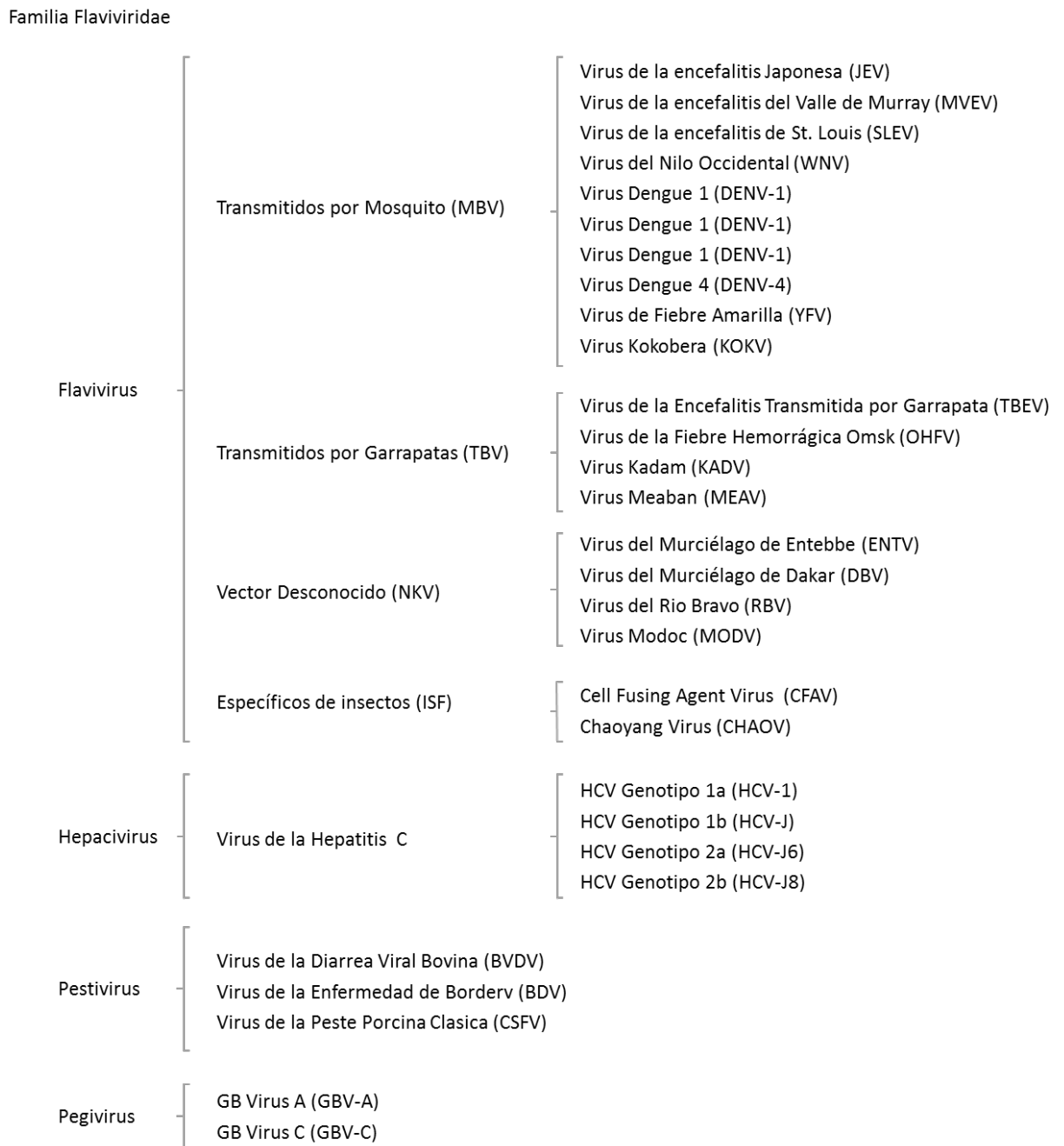


Figura 3. Clasificación de la familia Flaviviridae (Adaptado de *The International Committee on Taxonomy of Viruses* y *Lindenbach et al., 2013*).

Ciclo de transmisión del virus

El DENV entra al humano (*hospedador*), a través de la piel cuando un mosquito infectado se alimenta de la sangre del hospedador. Típicamente, cuatro días después de ser picado por un mosquito infectado, la persona desarrollará viremia (virus en sangre). La viremia permanece aproximadamente 5 días, pero puede prolongarse hasta un período de 12 días. No suelen detectarse signos de enfermedad durante el primer día de viremia. Alrededor del quinto día post infección es cuando las manifestaciones clínicas pueden mostrarse (o no), y suelen persistir cerca de una semana. Cuando un mosquito se alimenta de la sangre de un hospedador infectado, el mosquito se convierte en el *vector* del virus. Para resultar infectado, el mosquito debe alimentarse durante el período de viremia.

Una vez que el virus llega al intestino medio del mosquito, el DENV comienza a replicar dentro de las células del epitelio de dicho compartimento, y la progenie se libera al hemocele (cavidad en la cual circula la hemolinfa, parte del sistema circulatorio de invertebrados), en donde puede diseminarse e infectar tejidos secundarios, incluyendo las glándulas salivales. Este proceso comprende un periodo de 8-12 días, y luego de este tiempo, el mosquito infectado puede transmitir dengue a un nuevo hospedador durante su alimentación. Una vez adquirido el virus, el vector permanecerá infectado por el resto de su vida (3-4 semanas) y podrá continuar transmitiendo dengue a personas sanas durante todo ese tiempo (Figura 4).

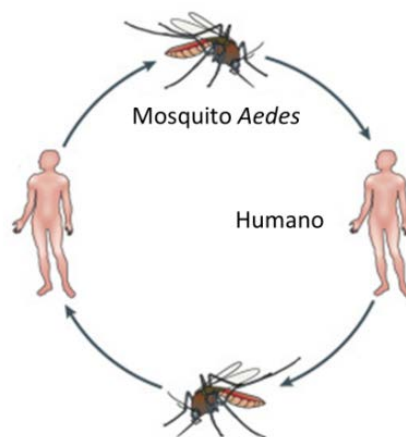


Figura 4. Ciclo humano de transmisión viral. La transmisión de DENV se propaga mediante el ciclado entre humanos (*hospedador*) y mosquitos (*vector*).

Los mosquitos, tanto machos como hembras, se alimentan de néctar de plantas, frutas y otros azúcares de plantas como principal fuente de energía. Sin embargo, las hembras necesitan alimentarse de sangre para producir huevos, es por esto que pican humanos. Cada hembra puede poner huevos en muchas oportunidades durante su vida, y *Ae. aegypti* se suele alimentar de sangre varias veces antes de cada deposición de huevos. Cuando un mosquito hembra es infectado con dengue, el virus está presente en sus glándulas salivares; al alimentarse, el mosquito le inyecta su saliva al humano para prevenir que la sangre coagule y facilitar así su alimentación. Es esta inyección de saliva lo que infecta al hospedador con el DENV.

Además del ya mencionado *ciclo humano* de transmisión (Figura 4), cada uno de los 4 serotipos de DENV también se mantiene en el llamado *ciclo selvático*, el cual es ecológica y evolutivamente distinto al ciclo humano (Figura 5). El ciclo selvático, que involucra a primates no humanos y a otros mosquitos del género *Aedes* que no suelen estar en contacto con el hombre, fue identificado en focos de transmisión en África occidental y la península de Malasia (Chen and Vasilakis, 2011).

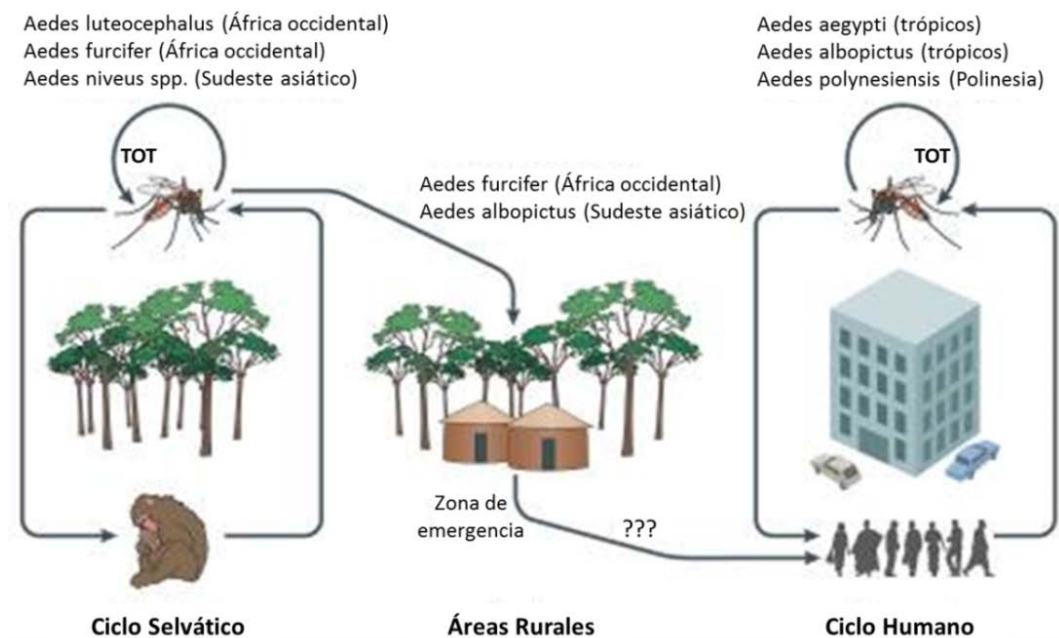


Figura 5. Origen selvático de DENV, y la zona de emergencia, en donde el ciclo selvático entra en contacto con poblaciones humanas en áreas rurales de África occidental y el sudeste asiático. Además, DENV puede persistir en poblaciones de mosquitos por transmisión transovárica (TOT), en la cual el mosquito infectado le transmite el virus a sus huevos (Adaptado de Vasilakis et al., 2011).

Manifestaciones clínicas y respuesta inmune

Luego de un período de incubación de 4-10 días, la infección con uno de los 4 serotipos de DENV puede producir una amplia variedad de manifestaciones clínicas, aunque la mayoría de los casos son asintomáticos o subclínicos. Los casos suaves se manifiestan como una gripe leve (fiebre por dengue, DF), mientras que los más severos presentan coagulopatía y aumento de la fragilidad vascular (fiebre hemorrágica por dengue, DHF), lo cual puede derivar en shock hemorrágico (shock por dengue, DSS). El tropismo celular y de tejido del virus podría tener un impacto fundamental en el desarrollo de la infección. Sin embargo, la ausencia de un modelo animal apropiado obstaculiza el entendimiento del rol que juega el tropismo en la infección por DENV. Estudios *in vitro* y autopsias sugieren que tres órganos tienen un rol fundamental en el desarrollo de DHF/DSS: el sistema inmune, el hígado y las células endoteliales que recubren a los vasos sanguíneos.

Tanto la respuesta inmune celular como la humoral contribuyen a la remoción del virus a través de la generación de anticuerpos neutralizantes y la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Además, la respuesta inmune innata también participa en la contención de la infección. Se cree que la infección primaria otorga protección inmunológica de por vida contra el serotipo contraído (Halstead, 1974). Sin embargo, está estipulado que la protección inmunológica cruzada contra un serotipo diferente al contraído permanece sólo por 2-3 meses luego de la infección primaria.

Existen factores de riesgo individuales que determinan la severidad de la enfermedad, como la edad, grupo étnico, nutrición, enfermedades crónicas, y si la infección es primaria o secundaria. Halstead y colegas observaron que la incidencia de DHF y DSS aumentaba en dos poblaciones de niños pequeños. El primer pico lo detectaron en niños de 6 a 9 meses de edad que habían sido infectados con un serotipo de DENV diferente del cual había infectado a sus madres previamente. La observación principal la hicieron al descubrir que las manifestaciones severas ocurrían en niños cuyos anticuerpos maternos se encontraban en niveles sub-neutralizantes. El segundo pico fue detectado en niños pequeños que habían experimentado dos infecciones con distintos serotipos de DENV, manifestándose generalmente la primera como

subclínica. Estas observaciones llevaron a concluir que la infección de individuos pre-inmunes a un serotipo diferente de DENV podría exacerbar la enfermedad, más que mitigarla. Se cree que este fenómeno podría ser causado por anticuerpos, y se debería a la llamada *amplificación de la enfermedad dependiente de anticuerpos (ADE)* (Halstead et al., 1970). En ADE, un serotipo de DENV utiliza los anticuerpos pre-existentes, generados en una infección primaria contra otro serotipo, para facilitar la entrada y consecuente infección de células con receptores Fc (por ejemplo, macrófagos). Estos anticuerpos pre-existentes generados contra otro serotipo al de la infección reconocen y unen al virus, pero no son capaces de neutralizarlo. La amplificación dependiente de anticuerpos podría resultar en la infección de un número mucho mayor de células, lo cual podría generar un aumento en la carga viral, tal como se observó en varios estudios.

A pesar de contar con diversos ensayos clínicos, la evidencia del rol de ADE en el desarrollo de la enfermedad de dengue sigue siendo circunstancial. Si bien algunos estudios han demostrado una correlación entre la capacidad de amplificación dependiente de anticuerpos en sueros, niveles de viremia y un mayor riesgo de manifestar DHF/DSS, no todos los casos severos están asociados con ADE, o con una infección primaria con un serotipo diferente, ni con títulos virales elevados.

Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico en laboratorio para confirmar la presencia de dengue pueden involucrar la detección del virus, su material genético, antígenos virales, anticuerpos, o una combinación de estas técnicas. Luego del comienzo de la enfermedad, el virus puede ser detectado en suero, plasma, células sanguíneas circulantes y otros tejidos durante 4-5 días. En etapas tempranas, el aislamiento del virus, de su ARN, o de antígenos virales pueden ser usados como diagnóstico de infección. Al final de la etapa aguda de la infección, los métodos serológicos suelen ser los elegidos para el diagnóstico. La Tabla 1 muestra un resumen de los métodos de diagnóstico más utilizados actualmente para DENV, así como también el tiempo de toma de muestra, el tiempo necesario para obtener el resultado y el costo de cada método, entre otros datos.

Método de diagnóstico	Diagnóstico durante fase aguda	Tiempo hasta el resultado	Muestra	Momento de toma de muestra	Instalaciones necesarias	Costo
Aislamiento de virus e identificación serotípica	Confirmado	1-2 semanas	Tejidos, suero, sangre	1-5 días	BSL-2/BSL-3, microscopios de fluorescencia, equipamiento de biología molecular	\$\$\$
Detección de ácidos nucleicos	Confirmado	1-2 días	Tejidos, suero, sangre, plasma	1-5 días	BSL-2, equipamiento de biología molecular	\$\$\$
Detección de antígenos	No determinado aún	1 día	Suero	1-6 días	Instalaciones para ELISA	\$\$
	Confirmado	>1 día	Tejido para inmunquímica	NA	Instalaciones para histología	\$\$\$
IgM ELISA	Probable	1-2 días	Plasma, suero, sangre	Luego de 5 días	Instalaciones para ELISA	\$
IgM test rápido		30 minutos			No se necesitan provisiones adicionales	
IgG mediante ELISA, HI o test de neutralización	Confirmado	7 días o más	Plasma, suero, sangre,	Suero de fase aguda, 1-5 días; convaleciente, luego de 15 días	Instalaciones para ELISA, BSL-2 para ensayos de neutralización	\$

Tabla 1. Resumen de los métodos de diagnóstico para DENV y sus características (Adaptado de WHO, 2009).

Prevención

Hasta la fecha, la única forma de prevenir la infección por DENV es mediante el control del mosquito vector y la protección individual ante picaduras. Sin embargo, se están realizando grandes esfuerzos para desarrollar vacunas efectivas y drogas antivirales. Las principales dificultades a considerar durante el desarrollo de una vacuna contra DENV están enumeradas en la Tabla 2.

Desarrollo
<ul style="list-style-type: none"> • Necesidad de una vacuna tetravalente. • Falta de un <i>Correlato de protección</i> adecuado, dado que se conoce sólo parcialmente el mecanismo de protección del sistema inmune contra DENV. Se estipula que los anticuerpos neutralizantes serían los principales responsables de la protección contra dengue. • Falta de un modelo animal adecuado que imite la enfermedad causada por el virus, y sirva para evaluar candidatos vacunales. • Potencial inmunopatogénesis, incluido ADE.
Implementación
<ul style="list-style-type: none"> • Necesidad de un seguimiento a largo plazo. • Necesidad de testeo tanto en Asia como en América. • Idealmente, testeo contra los 4 serotipos. • La localización, tiempo y composición genotípica/serotípica de las epidemias de dengue varían año a año y no son predecibles.

Tabla 2. Dificultades durante el desarrollo de vacunas contra DENV (Adaptado de WHO, 2009).

Actualmente se están evaluando varios candidatos de vacunas vivas atenuadas para DENV. Una de ellas consiste en una quimera tetravalente, en la que los genes estructurales E y prM de YFV se remplazaron por el gen equivalente de cada serotipo de DENV en el contexto de la cepa vacunal de fiebre amarilla, 17D. Esta vacuna fue aprobada en varios países de Asia y América Latina, pero se ha reportado una protección limitada contra algunos serotipos (Halstead and Russell, 2016). Otro candidato en desarrollo consiste en una vacuna tetravalente en dónde los genes estructurales de los 4 serotipos se encuentran incorporados en un *esqueleto* atenuado de DENV-2 (Osorio et al., 2015). También se está evaluando como posibilidad una vacuna atenuada a través de la remoción de 30 nucleótidos en el 3' UTR del genoma viral (Durbin et al., 2011). Sin embargo, aún quedan muchos estudios por realizar para evaluar la seguridad y los niveles de protección de estos y otros candidatos vacunales.

Antivirales

Dada la gran importancia mundial que el DENV está adquiriendo últimamente, y gracias a nuevos estudios de biología estructural, el desarrollo de drogas antivirales contra dengue es un camino que está tomando mucho protagonismo. Más aun, las lecciones aprendidas durante el desarrollo de antivirales para HIV y HCV podrían ser muy útiles a la hora de pensar estrategias para el desarrollo de drogas anti DENV. Siendo HCV y DENV miembros de la familia *Flaviviridae*, el trabajo realizado para HCV podría ser aprovechado para la búsqueda de drogas anti dengue (Olsen et al., 2004).

El concepto de que antivirales para dengue podrían ser útiles surge de estudios clínicos, en donde se estableció un vínculo entre elevados niveles de virus en sangre y una mayor probabilidad de desarrollo de DHF y DSS. Esta observación sugiere que el progreso a manifestaciones severas podría ser evitado mediante la administración de una molécula segura y potente, que tenga como blanco algún paso esencial en el ciclo de replicación viral. Más aun, también podría ser considerada como una estrategia profiláctica en áreas de alta circulación viral o riesgo elevado.

Es interesante mencionar que el desarrollo de fármacos ha sido habitualmente dirigido contra enzimas virales. Sin embargo, la idea de que proteínas virales multifuncionales podrían ser más susceptibles a interferencia por moléculas pequeñas ha empezado a considerarse. Un ejemplo es la proteína de cápside de HIV, en donde moléculas inhibitorias pequeñas pueden unirse a sitios de la misma e inducir o prevenir interacciones con otras proteínas, así como también cambios conformacionales. El desarrollo de resistencia a este tipo de compuestos es poco probable dado que las proteínas de cápside deben participar en muchas interacciones proteicas diferentes durante distintos momentos del ciclo viral. Es por esto que los procesos de ensamblado y desensamblado de la nucleocápside están surgiendo como blancos de una nueva generación de agentes antivirales (Klumpp and Crepin, 2014).

La partícula viral

La partícula viral de DENV es pequeña (~50nm de diámetro). La superficie de la misma está formada por una bicapa lipídica en la cual se encuentran embebidas dos proteínas virales: Envoltura (E) y Membrana (M). La eliminación de la superficie membranosa con detergentes no iónicos revela a la nucleocápside, la cual consiste de múltiples copias de la proteína de cápside y una única copia del genoma viral. La estructura de la partícula fue resuelta mediante una combinación de crío-microscopía electrónica, reconstrucción de imágenes y cristalografía de rayos X (Kuhn et al., 2002, Zhang et al., 2003a, Zhang et al., 2003b) (Figura 6).

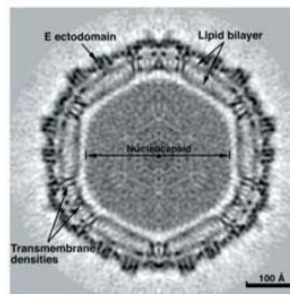


Figura 6. Crío-microscopía electrónica de la partícula viral de dengue (Zhang et al., 2003a)

La superficie viral está compuesta por 180 copias de E y prM/M. La proteína E se encuentra como 90 dímeros dispuestos de forma cabeza-cola paralelos a la membrana lipídica formando una cubierta proteica lisa (Kuhn et al., 2002). La proteína M es un pequeño fragmento generado por proteólisis de su precursor, prM. Luego de la escisión del péptido “pr” durante la maduración viral, M permanece como una proteína transmembrana debajo de la capa generada por E. Microscopías electrónicas de la partícula de DENV muestran un espacio de baja densidad electrónica entre la nucleocápside y la membrana lipídica, sugiriendo que no hay contactos entre E y M con cápside (Figura 6). Además, la nucleocápside no parece tener una organización simétrica, sugiriendo que la proteína de cápside actúa como un neutralizador de cargas y compactador del ARN viral, sin generar una estructura definida.

En las células infectadas, las partículas virales son inicialmente ensambladas con una organización estructural diferente a las partículas maduras. En estas partículas inmaduras, la proteína E está asociada a la glicoproteína prM formando heterodímeros

(Zhang et al., 2003b). Los virus inmaduros se vuelven infectivos cuando prM es escindida y el péptido pr liberado (Figura 7).

Las partículas virales de los flavivirus adoptan diversas apariencias a medida que atraviesan la vía secretoria. Apenas son ensambladas, las partículas inmaduras tienen un tamaño mayor (~60nm de diámetro) al de las partículas maduras, y exhiben 60 picos prominentes en su superficie. Cada protrusión está compuesta por tres heterodímeros de E-prM, con prM cubriendo el péptido de fusión de E. A medida que las partículas inmaduras atraviesan el ambiente ácido de la red del trans-Golgi, se produce una reorganización drástica de las glicoproteínas virales, transformándose en partículas con superficie lisa, casi indistinguible de las maduras. La única diferencia con estas últimas es que prM permanece como tal. El cambio conformacional mencionado es seguido por la escisión de prM por la proteasa del hospedador, furina, y la liberación del fragmento pr durante la salida del virus para generar partículas maduras. El proceso de escisión no suele ser eficiente, por lo que también se liberan cantidades significativas de partículas inmaduras y parcialmente maduras. A pesar de que las partículas inmaduras son consideradas como no infectivas porque no pueden sufrir fusión, recientemente se demostró que pueden iniciar la infección a través de complejos con anticuerpos anti prM en células con receptores Fc (Dejnirattisai et al., 2010, Rodenhuis-Zybert et al., 2010). El mecanismo, que no está bien caracterizado, podría recurrir a la escisión de prM en el endosoma, y sería especialmente relevante durante infecciones secundarias cuando los niveles de anticuerpos son elevados. Adicionalmente, se han detectado partículas parcialmente maduras, las cuales retienen sólo una proporción de prM. Las mismas pueden unirse y fusionarse iniciando así una infección similar a las partículas maduras.

Por último, además de secretar partículas maduras, parcialmente maduras e inmaduras, las células infectadas liberan al medio extracelular partículas subvirales más pequeñas (SVP) que no son infectivas. Las SVP contienen E y M, pero no poseen nucleocápsides en su interior (Smith et al., 1970). Estas pueden experimentar fusión similar a las partículas virales (Schalich et al., 1996), pero debido a la falta de genoma no son infectivas.

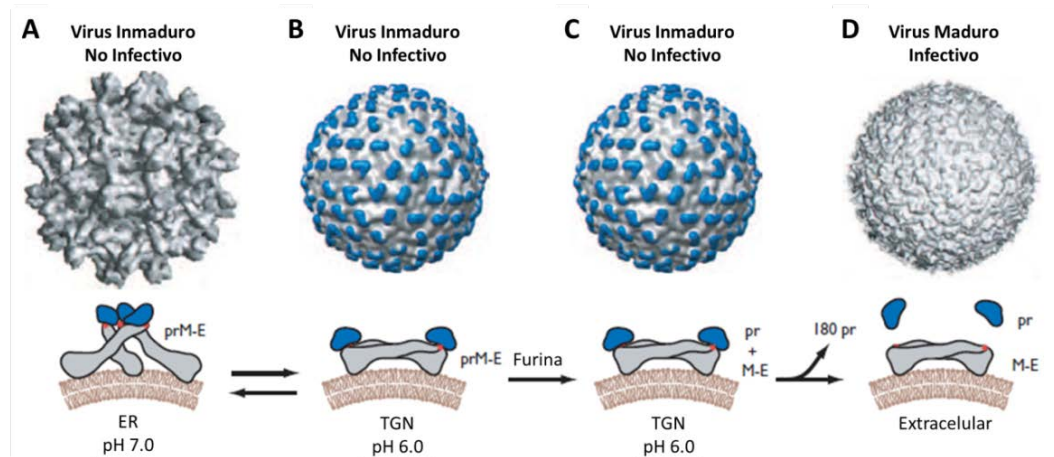


Figura 7. Maduración de partículas de DENV. Las partículas nacientes, no infectivas, sufren un cambio conformacional dependiente de pH en la glicoproteína E (gris) y el precursor de M (prM) (azul). Las partículas maduras, que son infectivas, se forman por el corte de prM y posterior liberación del fragmento pr (Adaptado de Perera and Kuhn, 2008)

El genoma viral

Al igual que para otros virus con ARN de polaridad positiva, el genoma de DENV es infectivo. Consiste en una molécula de ARN simple cadena y polaridad positiva, con una longitud aproximada de 11 kilobases (kb). En el extremo 5' posee un cap de tipo 1, $m^7GpppAmN$, el cual es utilizado para estabilizar el genoma viral, iniciar la traducción y eludir la defensa antiviral innata del hospedador (Zhao et al., 2015). A diferencia de los ARN mensajeros celulares, el DENV no posee cola de poliA en su extremo 3'. Estructuras secundarias y terciarias presentes en el ARN viral interactúan con factores virales y del hospedador y son fundamentales en el ciclo de replicación viral (Gebhard et al., 2011).

El genoma posee un único marco de lectura abierto (~3400 codones), flanqueado por regiones no codificantes (NCR) en los extremos 5' y 3' de ~100 nucleótidos (nt) y ~400nt respectivamente. En la región 5' no traducible (UTR) del virus se halla una estructura de ~70 nt llamada *stem loop A* (SLA), que funciona como el promotor para la síntesis del ARN viral (Filomatori et al., 2006). En el 3'UTR se localiza otra estructura de tipo *stem loop*, también compleja, conocida como *3' stem loop* (3'SL) (Figura 8). Ambas estructuras son esenciales para la replicación viral.

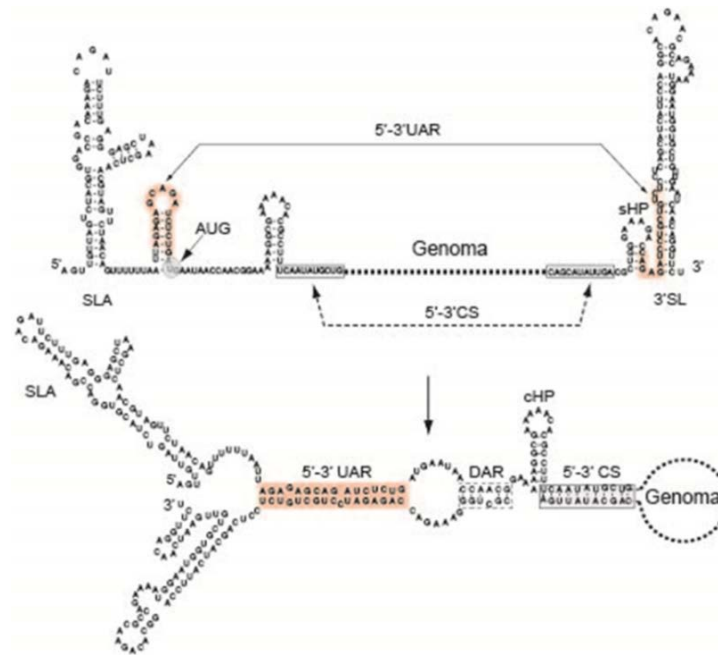


Figura 8. Estructuras lineal y circular del genoma de DENV (Villordo and Gamarnik, 2009).

Una característica importante del genoma de los flavivirus es la presencia de secuencias complementarias en los extremos de su ARN, las cuales median interacciones ARN-ARN de largo alcance y estimulan la circularización del genoma. En los MBF, estas interacciones están mediadas por las secuencias denominadas 5'UAR (región río arriba del AUG), 5'DAR (región río abajo del AUG), y 5'CS (secuencia conservada), las cuales se aparean con las regiones 3'UAR, 3'DAR y 3'CS respectivamente, ubicadas a más de 10kb de distancia (Gebhard et al., 2011).

La necesidad de complementariedad de secuencia entre los extremos 5' y 3' para la replicación viral fue demostrada mediante el uso de clones infecciosos de DENV y WNV (Alvarez et al., 2005a, Alvarez et al., 2005b, Friebe et al., 2011, Khromykh et al., 2001, Lo et al., 2003). Esto permitió, a través de genética reversa, realizar mutaciones en el genoma del virus y analizar su impacto en el ciclo viral.

Las interacciones de ARN de largo alcance son fundamentales para la replicación del genoma viral, ya que median el acercamiento de la polimerasa viral, NS5, unida su promotor SLA, al sitio de iniciación de la replicación en el extremo 3' del genoma (Filomatori et al., 2006). Es importante resaltar que la circularización requiere la disrupción de estructuras secundarias locales en los extremos 5' y 3', lo cual le da propiedades dinámicas a las estructuras de ARN del genoma viral (Villordo et al.,

2010). Por lo tanto, los cambios de conformación a gran escala dentro del genoma de los flavivirus podrían regular la utilización del mismo para la traducción y síntesis del ARN viral.

En particular la región codificante de cápside contiene una serie de estructuras de ARN que son necesarias para la replicación del genoma viral, limitando la manipulación genética de los residuos de la proteína. Un estudio reciente indicó que los primeros 160 de los 300nt que codifican para la proteína están involucrados en estructuras conservadas de ARN (de Borba et al., 2015). Por lo tanto, la incorporación de mutaciones dentro de la secuencia de cápside debe realizarse teniendo en cuenta el posible impacto en la replicación del genoma viral (Clyde et al., 2008, de Borba et al., 2015, Liu et al., 2013, Samsa et al., 2012, Villordo and Gamarnik, 2009).

Unión y entrada de DENV a la célula hospedadora

Se cree que el ingreso del DENV a la célula ocurre a través de endocitosis mediada por receptor, proceso que involucra la unión de la proteína viral E a receptores celulares. Un gran número de proteínas de superficie que interactúan con E han sido identificadas en células de mamífero y de mosquito en cultivo. Dada la gran variedad de líneas celulares susceptibles a infección por DENV, es probable que el virus reconozca a una molécula de la superficie celular relativamente ubicua, o pueda utilizar múltiples receptores para su internalización. Está propuesto que la interacción de E con glicosaminoglicanos presentes en la superficie celular, como el heparán sulfato, actuarían como factores de unión de baja afinidad favoreciendo la concentración de particular virales (Chen et al., 1997). Las lectinas de tipo C son proteínas que se unen a glicanos ricos en manosa y están involucradas en la infección de flavivirus a células dendríticas (DC). En particular, la lectina de tipo C *DC-SIGN* participaría como receptor de anclaje para DENV durante la infección de DC (Lozach et al., 2005, Navarro-Sanchez et al., 2003, Tassaneetrithep et al., 2003). Por otro lado, partículas virales opsonizadas con concentraciones subneutralizantes de inmunoglobulinas exhiben una unión e infección aumentada en células con receptores Fc.

Actualmente, las bases moleculares de la interacción de E con proteínas celulares que llevan a la internalización del virus, y la identidad de los receptores celulares siguen sin estar claras. Se sabe que el virus entra a la célula por endocitosis mediada por clatrina (Acosta et al., 2008, Acosta et al., 2009, Acosta et al., 2012, Krishnan et al., 2007, Mosso et al., 2008). En relación a esto, mediante seguimiento de partícula única se demostró que los viriones de DENV difunden a lo largo de la superficie celular hasta llegar a un surco preexistente revestido de clatrina (van der Schaar et al., 2008). Con la asistencia de dinamina, el surco revestido de clatrina evoluciona hacia una vesícula revestida de clatrina. Esta vesícula en la que está contenido el virus es transportada hacia endosomas tempranos, los cuales luego maduran a endosomas tardíos (van der Schaar et al., 2008). De cualquier modo, en ciertos casos parecería que la ruta de entrada de DENV podría depender de la cepa viral y de la línea celular en estudio, ya que también se reportó entrada de DENV independiente de clatrina (Acosta et al., 2009, Acosta et al., 2012).

Luego de la internalización y posterior acidificación del endosoma, ocurre la fusión entre la membrana viral y vesicular: en el ambiente ácido del endosoma, los dímeros de proteína E se disocian y sufren un cambio conformacional irreversible en el cual se vuelven trímeros fusogénicos (Modis et al., 2004, Nayak et al., 2009). El péptido de fusión, previamente escondido en la interfase del homodímero, se expone e inserta en la membrana endosomal y permite la liberación de la nucleocápside al citoplasma. La fusión de membranas viral y celular es un proceso que ha sido muy estudiado y está bien caracterizado (Stiasny et al., 2011); sin embargo, la disociación de la proteína de cápside del ARN viral, también llamado desnudamiento del genoma, es un proceso aún desconocido. Una vez en el citoplasma, el genoma viral cumple tres roles fundamentales en el ciclo viral: el de ARN mensajero (mARN) para la traducción de proteínas virales, el de molde durante la replicación del ARN, y el de material genético para ser empaquetado en nuevas partículas virales.

Ciclo de replicación viral

Luego del desnudamiento viral el genoma es liberado al citoplasma para actuar como un mRNA. La traducción de este mensajero en el retículo endoplásmico (ER), que tiene un único marco de lectura abierto (ORF) (Figura 9.A), da como resultado una poliproteína que adopta una disposición topológica compleja en la membrana del ER (Figura 9.B). Varios estudios recientes han contribuido a dilucidar la compleja disposición en la membrana del ER de las proteínas virales (Miller et al., 2007, Miller et al., 2006, Xie et al., 2013).

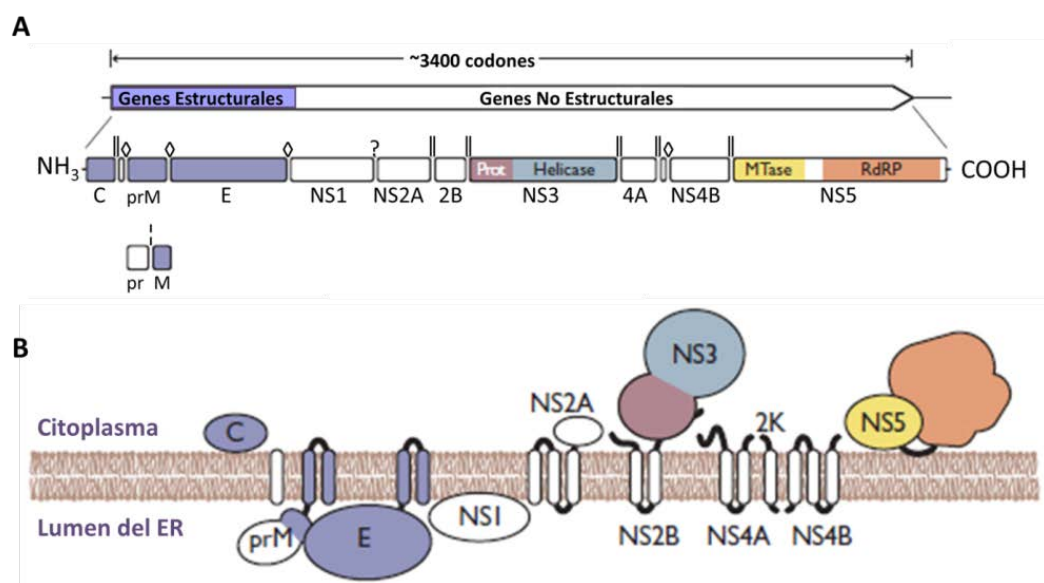


Figura 9. Estructura de la poliproteína de DENV. A. La poliproteína viral con sus sitios de procesamiento. Las proteínas estructurales se muestran en violeta, mientras que las NS en blanco o coloreadas, según sus subunidades enzimáticas. Se indican los sitios de corte por la señalasa del hospedador (♦), por la proteasa viral (|||), por Furina (;) y por una proteasa aún no identificada (?). Se muestra también el procesamiento de prM. **B.** Topología de la poliproteína en la membrana del ER. Las proteínas están aproximadamente a escala y representadas en el orden en el cual son sintetizadas a partir del mRNA (Adaptado de Lindenbach et al., 2013).

La poliproteína es procesada co- y post-traduccionalmente, generando al menos 10 proteínas maduras. La región N-terminal de la poliproteína codifica para las proteínas estructurales (cápside, prM y E), las cuales están seguidas por las 7 no estructurales (NS) (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (Rice et al., 1985). La señalasa del hospedador es responsable de la digestión entre el cápside/prM (lumen), prM/E, E/NS1, y 2K/NS4B. La proteasa viral NS2B-NS3 procesa los sitios entre cápside/prM (lado citoplásmico), NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K y NS4B/NS5. La

enzima responsable del sitio NS1/2A aún no ha sido identificada (Amberg et al., 1994, Cahour et al., 1992, Falgout and Markoff, 1995, Falgout et al., 1991). Por último, la proteasa furina es la encargada del procesamiento de prM en el aparato de Golgi durante la maduración de las partículas virales (Stadler et al., 1997).

La mayoría de las proteínas no estructurales de DENV poseen múltiples funciones: proporcionan las actividades enzimáticas y el ambiente adecuado para la replicación viral, remodelan membranas celulares y ayudan a eludir la respuesta antiviral del hospedador. Se ha reportado actividad enzimática para dos proteínas no estructurales: NS3, la cual posee actividad serina proteasa y helicasa de ARN (Cui et al., 1998, Falgout et al., 1991, Gorbalenya et al., 1989), y NS5, con actividad polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp) (Koonin, 1991, Yon et al., 2005, You and Padmanabhan, 1999). NS5 también posee actividad metiltransferasa y está involucrada en el *capping* del genoma viral (Egloff et al., 2002, Koonin, 1993).

Una vez traducidas y procesadas las proteínas virales, ocurre un rearrreglo de las membranas celulares generando estructuras asociadas al ER denominadas "*convoluted membranes*" (CM) donde está propuesto que se llevaría a cabo el procesamiento de la poliproteína viral. Estudios bioquímicos de células infectadas muestran que la actividad replicasa se concentra en fracciones membranosas densas enriquecidas en la mayoría de las proteínas NS (NS1, NS2A, NS3, NS4A y NS5). En relación a esto, en células infectadas se identificaron estructuras denominadas "*vesicle packets*" (VP), las cuales tienen un diámetro aproximado de 100nm y se encuentran rodeadas por una membrana externa (Gillespie et al., 2010, Mackenzie et al., 1996, Miorin et al., 2013, Welsch et al., 2009). Los VP se proponen como los sitios dentro de los cuales ocurre la síntesis de ARN, en los llamados complejos de replicación. En la Figura 10 se muestran las tomografías electrónicas que revelaron que los VP son invaginaciones del ER y que se encuentran conectados con el citosol a través de un poro (Welsch et al., 2009).

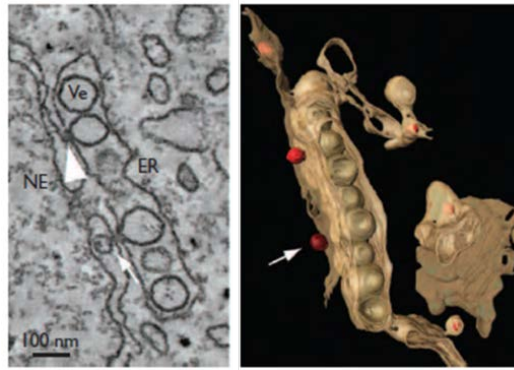


Figura 10. Tomografía electrónica que muestra las vesículas inducidas por DENV (Panel izquierdo). Representación tridimensional de las membranas del ER y Golgi (amarillo), localización de las partículas virales (rojo), y un sitio putativo Brotación del virus (flecha) (Panel derecho) (Adaptado de Welsch et al., 2009).

La replicación del ARN viral comienza con la síntesis de la cadena negativa complementaria al genoma, la cual es utilizada como molde para la amplificación de nuevas copias de ARN genómico. Este proceso es catalizado por NS5, en asociación con la helicasa NS3 y otras proteínas NS, además de factores celulares. La síntesis del ARN viral es asimétrica, con aproximadamente 10 veces más hebras positivas en comparación con la acumulación de hebras negativas. Durante la replicación viral en el hospedador, además de las cadenas positiva y negativa, se generan fragmentos subgenómicos (sfRNAs) de 0,2-0,6kb aproximadamente (Pijlman et al., 2008). Estos fragmentos, que contienen en mayor o menor medida al 3'UTR, provienen de la degradación incompleta del genoma viral y son producidos por la exoribonucleasa celular XRN-1. La resistencia a la degradación por XRN-1 de esta región se debe a estructuras secundarias y terciarias conservadas en el 3'UTR viral (Chapman et al., 2014). Si bien existe controversia al respecto, se postula que los sfRNAs son necesarios para aumentar la eficiencia en la replicación del ARN viral por medio de la evasión de la respuesta antiviral innata de la célula (Clarke et al., 2015).

Las nuevas copias de genoma viral pueden ser traducidas para producir más proteínas virales o asociarse con cápside para generar partículas virales nuevas. Aún no se conoce el mecanismo por el cual cápside recluta al genoma durante la morfogénesis. Al igual que en la replicación, la morfogénesis viral se produce en estrecha asociación con membranas celulares. Se cree que el proceso de ensamblado de partículas comienza con la asociación de dímeros de cápside con el genoma viral, seguido por la

brotación de la nucleocápside al lumen del ER, en donde adquiere la bicapa lipídica con las proteínas E y prM embebidas en la misma (Figura 11).

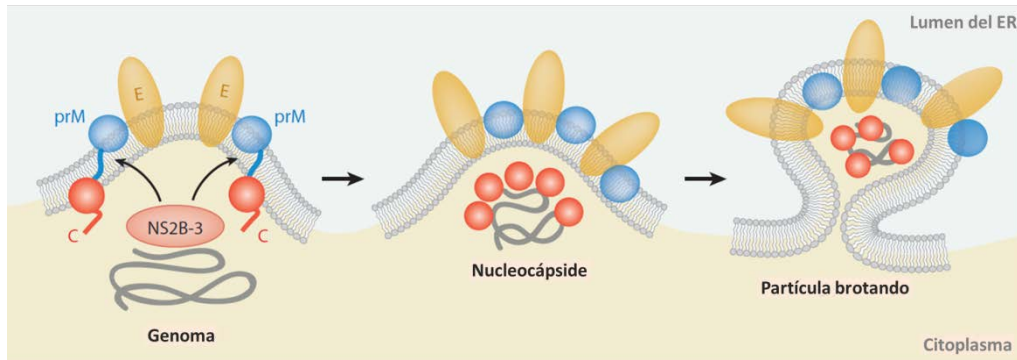


Figura 11. Modelo del ensamblado de la partícula viral de dengue. Se muestra la maduración en la membrana del RE de cápside por el corte de NS2B-3. A continuación, se esquematiza a la partícula viral brotando al lumen del ER, conteniendo a la nucleocápside, E y prM en la membrana lipídica (Byk and Gamarnik, 2016).

Luego del ensamblado, las partículas inmaduras son transportadas a través de la vía secretoria y liberadas al medio extracelular. Es durante la secreción, en el medio ácido, cuando las partículas inmaduras sufren los rearrreglos en E-prM y el procesamiento de prM (Yu et al., 2008). En la Figura 12 se puede ver un resumen esquemático del ciclo de replicación del DENV.

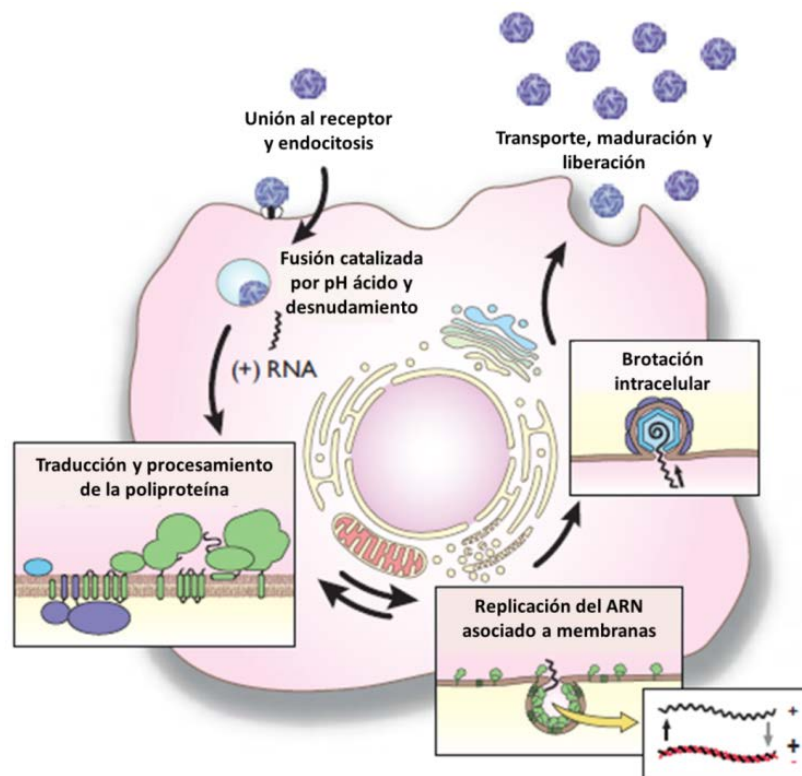


Figura 12. Esquema del ciclo de replicación de DENV. (Adaptado de Lindenbach et al., 2013).

Las partículas virales liberadas al medio extracelular son una mezcla de partículas maduras, inmaduras, parcialmente maduras y SVP (Junjhon et al., 2010, Mukhopadhyay et al., 2005).

La proteína de cápside

Cápside es una proteína pequeña de 11 kDa, con una alta densidad de residuos básicos. Si bien la proteína de cápside de los distintos flavivirus no presenta una muy alta similitud de secuencia, existe mucha conservación en características estructurales y de función (Figura 13).

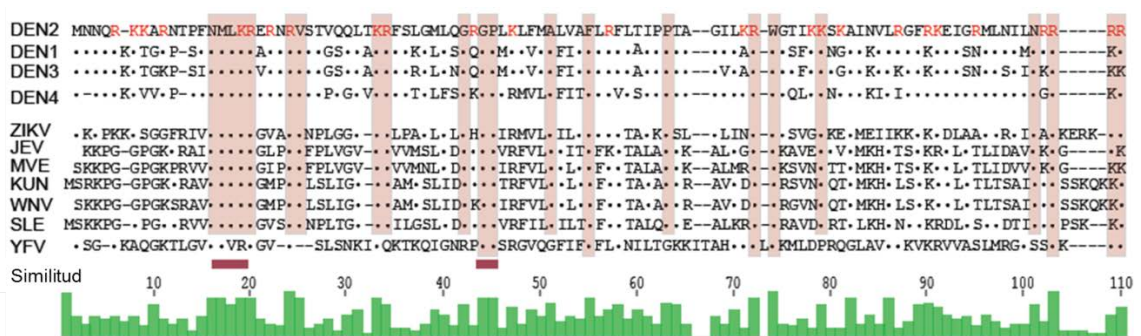


Figura 13. Alineamiento aminoacídico de proteínas de cápside de flavivirus transmitidos por mosquito (MBF).

La proteína naciente contiene en su extremo C-terminal una cola hidrofóbica, la cual sirve como péptido señal para la translocación de prM al lumen del ER. Este “ancla” es escindido en dos pasos: primero por la proteasa viral NS2B-3 del lado citoplasmático, y luego por la signalasa del hospedador del lado del lumen del ER (Figura 14) (Stocks and Lobigs, 1998).

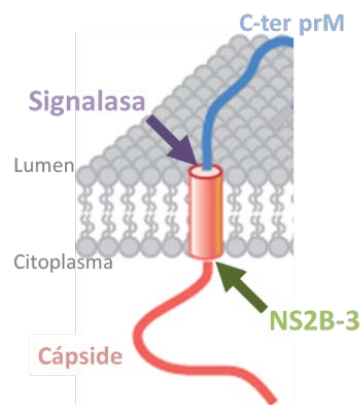


Figura 14. Esquema de la orientación de las proteínas cápside y prM en la membrana del ER. La flecha violeta indica el sitio de corte de la signalasa, y la flecha verde el de la proteasa viral, NS2B-3.

La proteína de cápside madura, cuya estructura tridimensional se resolvió por RMN (Ma et al., 2004), está compuesta por cuatro α -hélices (α 1-4) y una región N-terminal desestructurada, y forma homodímeros en solución (Figura 15). Aproximadamente el 25% de los aminoácidos que constituyen la proteína de cápside de DENV son básicos. Al analizar la distribución de los mismos en la estructura primaria de la proteína se puede apreciar una sobrerrepresentación en las regiones N-terminal y α 4. Es por esto que se propuso que estas dos regiones serían las responsables de interactuar con el ARN viral. A su vez, la región hidrofóbica α 2/ α 2' mediaría la interacción de cápside con membranas (Figura 16).

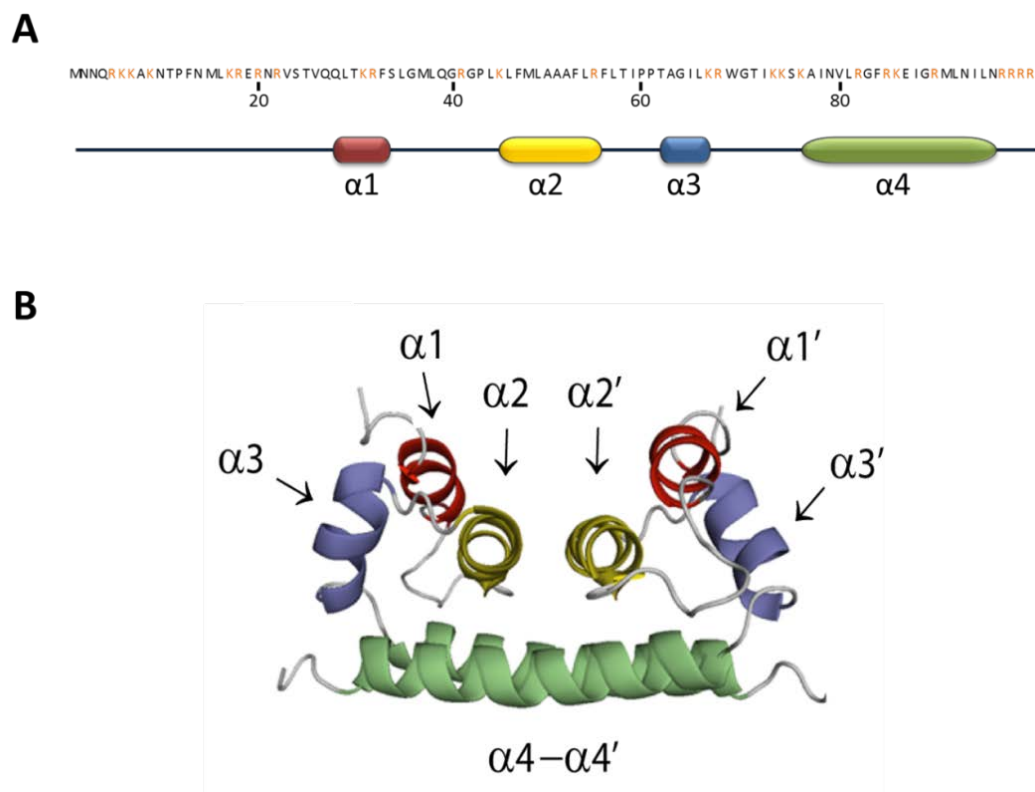


Figura 15. **A.** Secuencia de la proteína de cápside, se indica qué aminoácidos conforman cada α -hélice. **B.** Estructura tridimensional del homodímero de proteínas de cápside. La región N-terminal no está representada. Se muestran las 4 α -hélices de cada monómero: α 1 (roja) α 2 (amarilla), α 3 (azul) y α 4 (verde) (Adaptado de Ma et al., 2004).

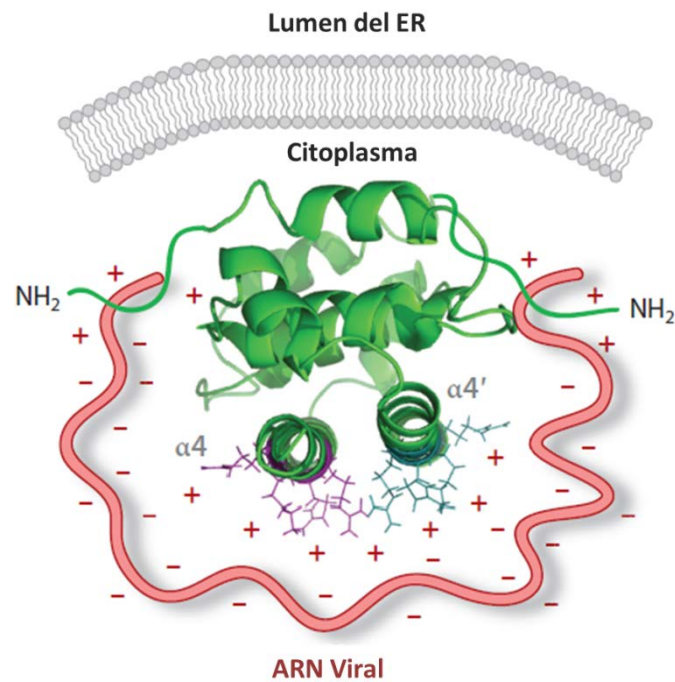


Figura 16. Se muestran las 4 α -hélices de cada monómero y las regiones propuestas en la interacción con membranas y con el genoma viral (Byk and Gamarnik, 2016).

Las proteínas de cápside de flavivirus poseen una notable flexibilidad funcional, siendo capaces de tolerar grandes deleciones. La proteína de cápside de YFV conserva la habilidad de empaquetar el ARN viral aun con deleciones de hasta 40 residuos de su N-terminal, y 27 residuos de su C-terminal (Patkar et al., 2007). Deleciones internas de las secuencias hidrofóbicas son menos toleradas. Cápside de TBEV puede aceptar deleciones de hasta 16 aminoácidos de su hélice hidrofóbica central, aunque se incrementa la producción de partículas vacías. Mutantes con deleciones mayores no son viables pero pueden ser rescatadas mediante mutaciones que aumenten la hidrofobicidad (Kofler et al., 2002, Kofler et al., 2003). WNV tolera pequeñas deleciones en varias posiciones de la hélice hidrofóbica $\alpha 2$ (Schlick et al., 2009).

No está claro cómo es la organización de los dímeros de cápside en la aparentemente desordenada nucleocápside, pero la interacción con ARN o ADN puede inducir que los homodímeros de cápside se ensamblen en estructuras similares a nucleocápsides *in vitro* (Kiermayr et al., 2004).

Con respecto a la localización subcelular de la proteína de cápside, la misma se detecta en el citoplasma, ER y núcleo de células infectadas (Figura 17). En el citoplasma de células infectadas, la proteína de cápside madura se acumula en organelas derivadas del ER denominadas lipid droplets (LD), tanto en células de mosquito como de mamífero (Samsa et al., 2009). Mediante un análisis mutacional, se identificaron los residuos de cápside involucrados en esta asociación: L50 y L54. Al sustituir dichos residuos no sólo se impidió la asociación de cápside con LD, sino que se afectó la formación de partículas virales (Samsa et al., 2009). Se vio además que la proteína de cápside utiliza una función no canónica de la vía celular GBF1-Arf-COPI durante su acumulación en LDs (Iglesias et al., 2015).

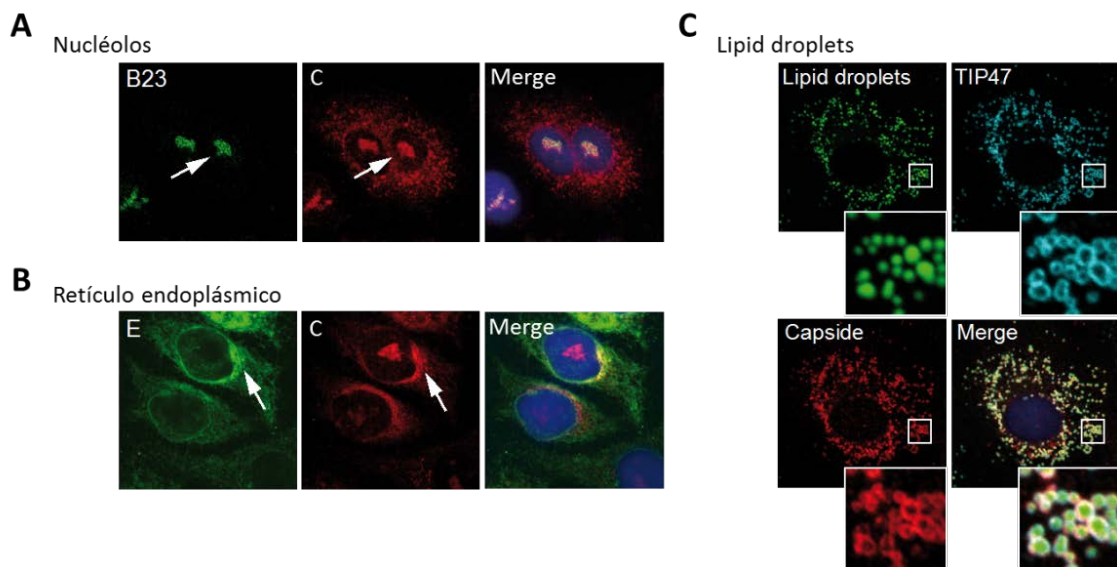


Figura 17. Localización subcelular de la proteína de cápside en células de mamífero infectadas. A. Localización nucleolar de cápside; en verde se marca a la proteína nucleolar B23. B. Localización en ER; en verde se marca a la proteína viral E, la cual posee localización en retículo endoplásmico. C. Localización en LD; en azul se marca a la proteína celular Tip47 con localización en lipid droplets y en verde los LD. En todos los casos la proteína de cápside está marcada en rojo.

La localización nucleolar ha sido descrita en células de mamífero para la proteína de cápside de diversos flavivirus. En el caso de DENV, se han propuesto tres señales de localización nuclear (NLS) (Bulich and Aaskov, 1992), las cuales involucran a los aminoácidos KKAR (aminoácidos 6-9), KKSK (aminoácidos 73-76) y un NLS bipartito, RKEIGRMLNILNRRRR (aminoácidos 85-100). Sin embargo, existen reportes contradictorios respecto a cuáles de estas señales son las que están realmente

involucradas en la localización nuclear de cápside (Bulich and Aaskov, 1992, Sangiambut et al., 2008, Wang et al., 2002).

La proteína de cápside cumple dos funciones principales durante el ciclo de replicación del virus: liberar al RNA para que pueda ser traducido una vez que se inicia la infección, y reclutar y empaquetar al genoma viral durante la morfogénesis de DENV. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos que gobiernan dichos procesos. Este trabajo de tesis se centró en entender el funcionamiento de la proteína de cápside en los procesos recién mencionados.

OBJETIVOS

Objetivo General

En este trabajo de tesis nos propusimos estudiar los mecanismos por los cuales la proteína de cápside del DENV recluta y libera al ARN genómico durante la morfogénesis y el desnudamiento viral. Para ello realizamos estudios *in vivo* (en células infectadas) e *in vitro* (empleando métodos bioquímicos), y desarrollamos nuevas herramientas genéticas que permitieron manipular a la proteína de cápside en el contexto de la infección. El abordaje de este trabajo incluyó los siguientes objetivos específicos:

Objetivos Específicos

1. Identificar determinantes en la proteína de cápside para la formación de partículas virales.
2. Estudiar propiedades bioquímicas de la proteína de cápside por medio de espectrometría de masa.
3. Estudiar el proceso de desnudamiento del genoma del DENV.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1. Identificar determinantes en la proteína de cápside para la formación de partículas virales

Estudio de residuos básicos de cápside necesarios para la producción de partículas infectivas en células de mamífero

Tal como se planteó en la introducción, el N-terminal y C-terminal de la proteína de cápside son las regiones con mayor densidad de cargas positivas, constituyendo los posibles puntos de interacción electrostática con el ARN viral. Los requerimientos de la región N-terminal involucrados en la encapsidación viral se caracterizaron recientemente en nuestro laboratorio (Samsa et al., 2012). Sin embargo, el resto de la proteína de cápside no había sido estudiada hasta el comienzo de esta tesis. Con el fin de analizar la función de los aminoácidos básicos ubicados en las regiones $\alpha 3$ y $\alpha 4$ de la proteína de cápside en la producción de partículas virales, se diseñaron mutantes con sustituciones en todas las lisinas y argininas de dichas regiones, las cuales fueron reemplazadas por alaninas en el contexto del genoma entero del virus. En un primer análisis, los residuos básicos se agruparon en tres grupos: Mut 1 (K67R68A), Mut 2 (K73K74K76A) y Mut 3 (R82R85K86R90A), señalados en la Figura 18.

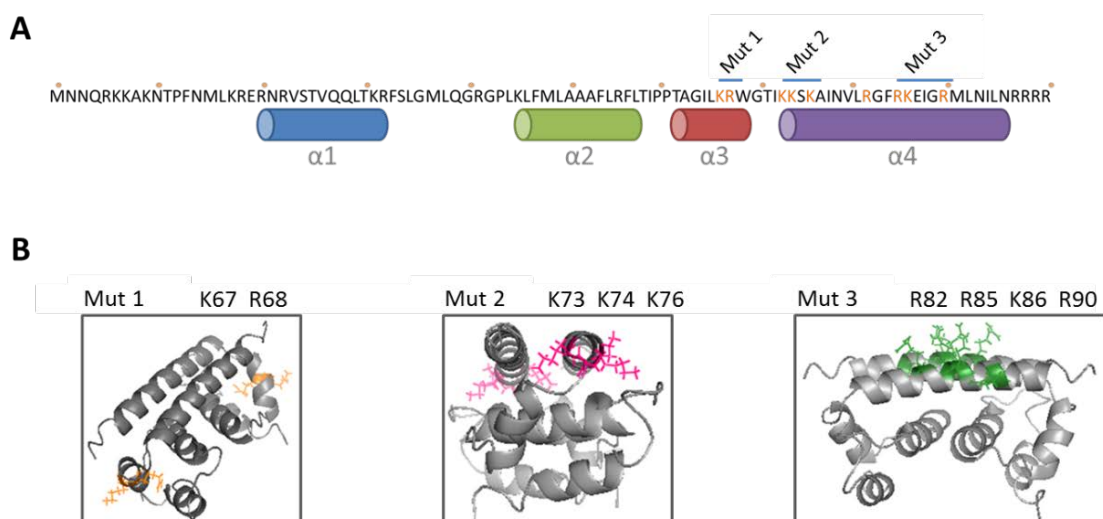
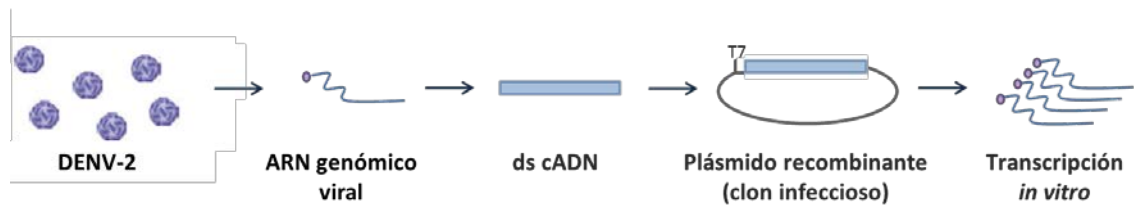


Figura 18. **A.** Secuencia aminoacídica de la proteína de cápside del DENV. En naranja se indican los cambios realizados en cada una de las mutantes (Mut 1, Mut 2 y Mut 3). Los cilindros representan las cuatro regiones α -hélice (de $\alpha 1$ a $\alpha 4$). **B.** Ubicación de los residuos sustituidos en cada mutante en la estructura de la proteína de cápside.

Con el fin de incorporar las mutaciones en la proteína de cápside se empleó un sistema de genética reversa (Figura 19). Las sustituciones a evaluar se incorporaron por PCR en un clon infeccioso (copia en ADN del genoma viral introducida en un plásmido), que luego fue utilizado como molde para la generación, por transcripción *in vitro*, de los ARNs virales. Estos últimos se emplearon para transfectar células e iniciar la replicación viral.



*Figura 19. Construcción del clon infeccioso de DENV-2. El clon infeccioso se obtuvo por transcripción reversa del genoma viral y la inserción del ADN copia en un plásmido recombinante (Kinney et al., 1997). Como el genoma se encuentra bajo el promotor de la polimerasa del fago T7 es posible obtener moléculas infectivas del ARN viral por transcripción *in vitro*.*

Las mutaciones en cápside se incorporaron en un clon infeccioso de dengue denominado virus reportero (DV-R), el cual consiste en una modificación del clon infeccioso original (pD2/ICAflIII) con una inserción del gen que codifica para la luciferasa de Renilla (Figura 20) (Samsa et al., 2009). Como ya se mencionó anteriormente, el genoma de DENV posee en la región de cápside señales superpuestas a nivel de ARN y proteína. El DV-R fue diseñado con el objetivo de poder disociar las señales en el ARN que actúan *in cis*, de la región que codifica para cápside. Esto se logró introduciendo una duplicación de los primeros 104 nucleótidos de la región que codifica para cápside, llamada *cis acting element* (CAE), previo a la secuencia de la luciferasa. Dicha duplicación permite realizar mutaciones en cápside sin afectar las secuencias de ARN necesarias para que el genoma se circularice y replique, ya que dichas secuencias de ARN están presentes en CAE, además de estar presentes en la región que codifica para cápside (Figura 8 y Figura 20).



Figura 20. Esquema del diseño del virus reportero, DV-R

Midiendo los niveles de actividad luciferasa luego de las transfecciones con los ARNs provenientes de transcripciones *in vitro* del virus reportero es posible estudiar cada etapa del ciclo viral: traducción, replicación del genoma y propagación.

Para analizar el impacto de las sustituciones de residuos específicos de cápside en el ciclo viral, se transfectaron células de mamífero con los ARNs de DV-R WT y mutantes correspondientes a los tres grupos mencionados (Figura 21). En este experimento se emplearon además dos controles: un ARN con una mutación en la polimerasa viral, cuyo genoma sirve como molde de traducción pero no puede amplificarse (NS5), y un ARN sin la proteína de cápside, cuyo genoma es capaz de ser amplificado pero no puede encapsidarse (ΔC). Con el fin de evaluar los niveles de traducción y síntesis de ARN del virus WT y mutantes, se determinó la actividad de la luciferasa en función del tiempo. Se analizaron extractos celulares a 6 horas post transfección (hpt) para evaluar la eficiencia de la traducción, y a 24 y 48 hpt para determinar la amplificación del genoma viral.

La actividad luciferasa en función del tiempo de la mutante ΔC es comparable al virus WT, indicando que la ausencia de la proteína de cápside no afecta la replicación del genoma viral. Asimismo, los niveles de luciferasa a 24 y 48 hpt del virus con la polimerasa viral mutada, NS5, confirman la ausencia de amplificación del genoma viral (Figura 21). Los resultados de las mutantes muestran que los genomas pertenecientes a Mut 1, Mut 2 y Mut 3 presentan niveles de luciferasa comparables al DV-R WT, tanto a las 6, 24 y 48 hpt, indicando que las mismas traducen y replican eficientemente su genoma (Figura 21).

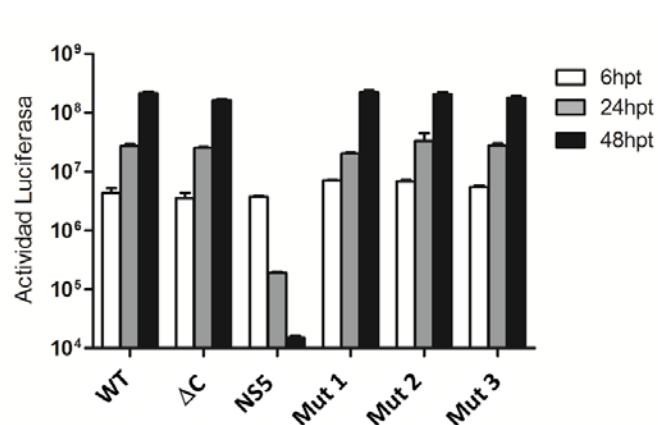


Figura 21. Transfección de células BHK con los ARN de DV-R del virus WT o mutantes.

Para analizar la producción y liberación de partículas virales, se colectó el medio extracelular a las 48 hpt y se lo empleó para evaluar la presencia de virus en el sobrenadante por medio de la infección de células frescas. Así, se confirma que la mutante ΔC no produce partículas infectivas, a diferencia de lo observado para el DV-R WT (Figura 22).

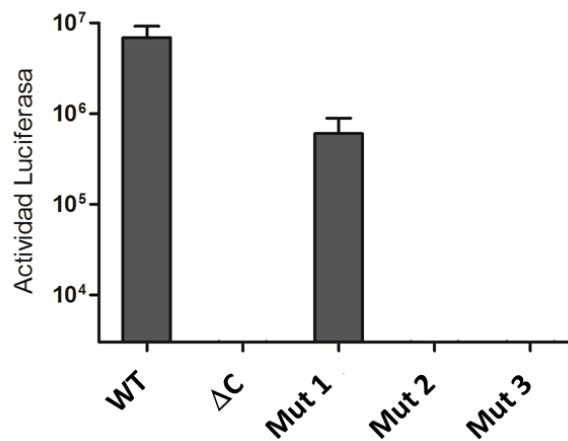


Figura 22. Infección de células de mamífero con los sobrenadantes de transfección provenientes de la Figura 21.

En los ensayos de infectividad, presentados en la Figura 22, los valores de actividad luciferasa de Mut 2 y Mut 3 son similares a los de ΔC , lo cual sugiere que dichas mutantes no producen partículas virales infectivas. A diferencia de esto, Mut 1 muestra una reducción de aproximadamente 10 veces en la capacidad de producir partículas infectivas en comparación a DV- R WT. Estos resultados sugieren un rol esencial de los residuos básicos presentes en Mut 2 y Mut 3 en la encapsidación del genoma viral.

Contribución individual de los aminoácidos básicos de la región $\alpha 4$ de cápside en la propagación viral en células de mamífero

Con el objetivo de estudiar el rol de cada uno de los aminoácidos que conforman las mutantes previamente descritas, se decidió realizar sustituciones individuales de los residuos básicos presentes en las Mut 2 (K73K74K76) y Mut 3 (R82R85K86R90) de la proteína de cápside. Las sustituciones puntuales fueron incorporadas al DV-R a través

de mutagénesis dirigida, y la capacidad de los ARN de generar partículas virales fue analizada.

De esta forma, se diseñaron las mutantes individuales K73A, K74A, K76A, R82A, R85A, K86A Y R90A. Los ARN de cada una de estas mutantes se obtuvieron mediante transcripción *in vitro*, y se emplearon para transfectar células en cultivo.

Las mutaciones introducidas en cápside no afectaron la traducción ni la amplificación del genoma viral (Figura 23.A y Figura 24.A).

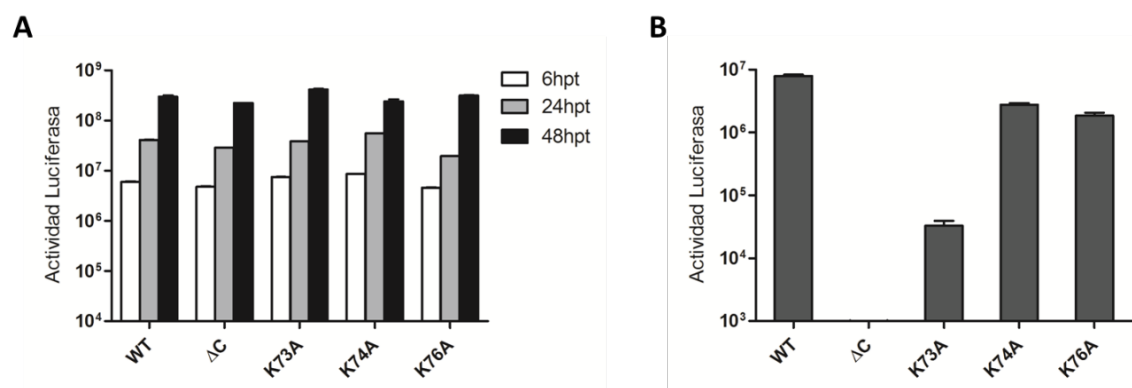


Figura 23. **A.** Transfección de células BHK con los ARN de DV-R del virus WT o mutantes individuales de Mut 2. **B.** Infección con los sobrenadantes de 48 hpt obtenidos en las transfecciones presentadas en A.

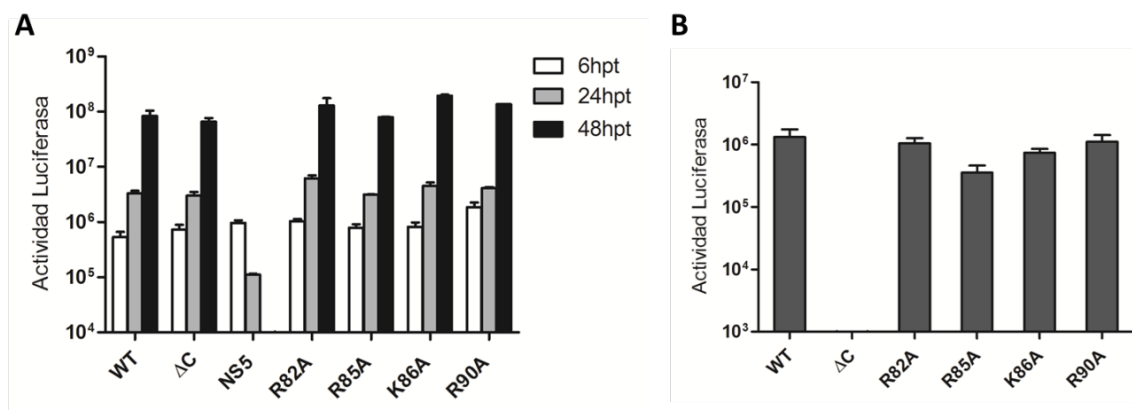


Figura 24. **A.** Transfección de células BHK con los ARN de DV-R del virus WT o mutantes individuales de Mut 3. **B.** Infección con los sobrenadantes de 48 hpt obtenidos en las transfecciones presentadas en A.

El análisis de producción de partículas virales indicó que la sustitución individual K73A redujo aproximadamente 500 veces la producción de partículas infectivas, mientras que las mutantes K74A y K76A sufrieron una reducción de entre 2 y 5 veces respectivamente, en relación al virus WT (Figura 23.B). Sorprendentemente, las sustituciones individuales de Mut 3 mostraron un defecto leve en producción de partículas infectivas, siendo la mutante R85A la única que presentó una disminución aproximada de 5 veces. Esto indica que las sustituciones incorporadas en la Mut 3 tienen un efecto aditivo, y que los residuos individuales no poseen un rol fundamental por si mismos (Figura 24.B).

Para evaluar esta posibilidad se construyeron mutantes con combinaciones de sustituciones dobles (Figura 25). Lo que se aprecia en este caso es que las mutaciones de a pares, aun cuando están conformadas por residuos que sustituidos individualmente no presentan efecto, reducen en gran medida la producción de partículas virales infectivas (Figura 25.B). Como era esperable, la mutante doble que contiene a la sustitución en K73 es la más drástica. Es notable la reducción en infectividad de 100 veces de la doble mutante R85K86A.

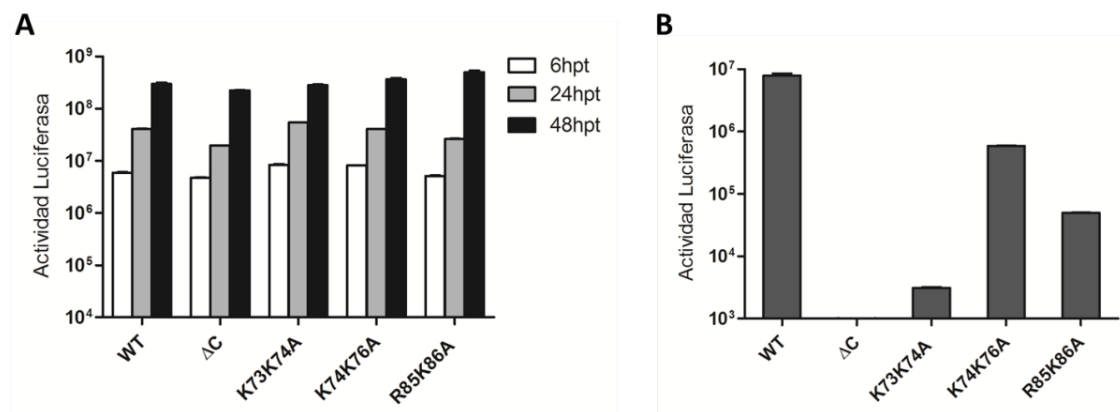


Figura 25. **A.** Transfección de células BHK con los ARN de DV-R del virus WT o mutantes dobles de Mut 2 y Mut 3. **B.** Infección con los sobrenadantes de 48 hpt obtenidos en las transfecciones presentadas en A.

Con el fin de confirmar las observaciones sobre el impacto de las mutaciones analizadas en las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 4$, se procedió a trabajar con el DENV sin el gen reportero. Para ello, se incorporaron las sustituciones individuales y combinadas en el clon infeccioso del dengue de serotipo 2 (pD2/ICAflII), se realizaron transcripciones *in*

in vitro de las mutantes y se transfectaron células de mamífero en cultivo. Las transfecciones se realizaron con bajas concentraciones de ARN para poder, a través de inmunofluorescencias indirectas (IFI) contra antígenos virales, estudiar las propiedades de propagación de cada construcción (Figura 26).

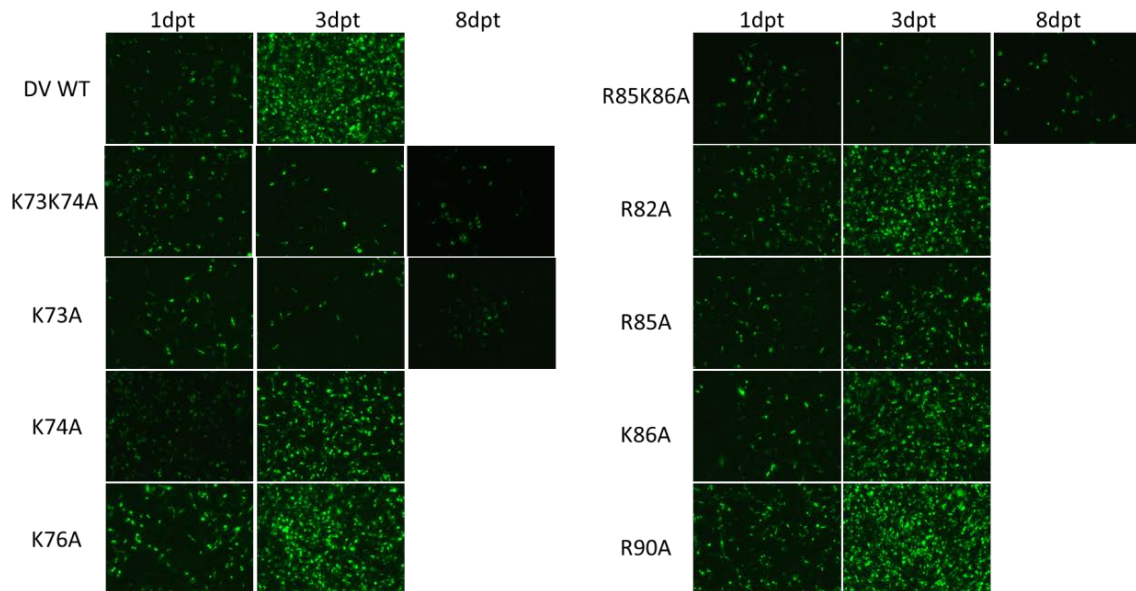


Figura 26. Inmunofluorescencias indirectas contra la proteína E de DENV en función de los días post transfección. Las mismas evidencian la propagación de los virus WT y mutantes en células de mamífero.

Los ensayos de IFI confirman el requerimiento de un residuo básico en la posición 73 para la propagación viral. Además, se corroboró que la remoción simultánea de dos cargas positivas en las posiciones 85 y 86 resulta en un virus con propagación altamente retrasada. Estas observaciones son consistentes con los resultados obtenidos en las mediciones realizadas con el sistema de virus reportero.

Procesamiento de las mutantes de la proteína de cápside

Con el fin de determinar si las mutaciones introducidas podrían tener un efecto sobre la expresión, plegamiento o procesamiento de cápside, se realizaron western blots de extractos celulares provenientes de transfecciones con ARNs de virus con distintas mutaciones en cápside. Los resultados, presentados en la Figura 27, muestran que en las mutantes K73A, K73K74A y R85K86A, 3 construcciones con propagación muy afectada, la proteína de cápside se expresa y procesa eficientemente.

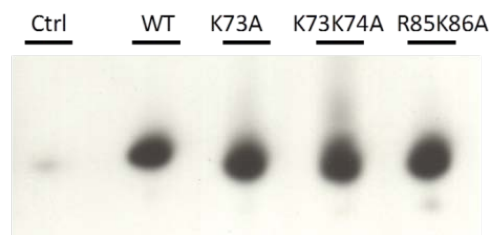


Figura 27. Western blot contra la proteína de cápside de extractos celulares de células de mamífero transfectadas con ARN de los virus WT y mutantes.

Por lo tanto, estos estudios nos permiten concluir que los que los defectos en propagación de las mutantes más drásticas no son causados por una disminución en la expresión o un mal plegamiento y consecuente degradación de la proteína de cápside.

Localización subcelular de las mutantes de la proteína de cápside

Para estudiar si alguna de las mutaciones introducidas en cápside podría estar afectando la localización subcelular de la proteína, se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos contra cápside. Se analizaron tanto las mutantes individuales como las dobles que conforman las Mut 2 y Mut 3. Variando la técnica de fijación de las células transfectadas se analizó la presencia de cápside en nucleolos y LDs (Figura 28 y Figura 29 respectivamente).

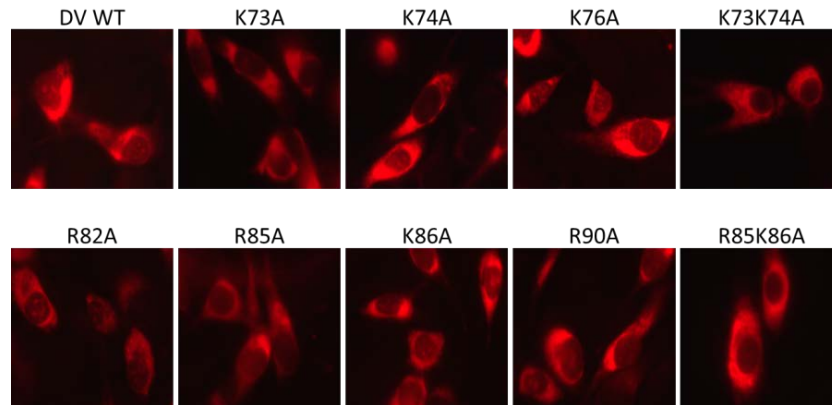


Figura 28. Inmunofluorescencias indirectas (fijación con metanol) contra la proteína de cápside de DENV que evidencian la localización en nucléolos de los virus WT y mutantes en células de mamífero.

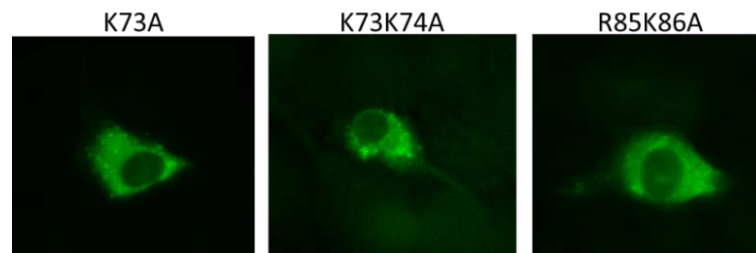


Figura 29. Inmunofluorescencias indirectas (fijación con paraformaldehído) contra la proteína de cápside de DENV que evidencian la localización en LD de los virus mutantes con menor tasa de replicación en células de mamífero.

Para todas las mutantes se pudo observar a la proteína de cápside en LDs, lo cual es relevante ya que está reportado que la falta de asociación de cápside a este compartimento compromete la formación de partículas virales (Samsa et al., 2009). Por el contrario, la localización nucleolar de cápside se vio disminuida en las construcciones K73A, K73K74A, R85K86A y R85A. Esto indica una posible correlación entre la localización en nucleolos de cápside y una eficiente producción de partículas virales. Sin embargo, debido a que los NLS están formados por regiones en las que hay acumulación de residuos básicos, y que la interacción con el genoma viral también requiere cargas positivas, es difícil dissociar estas dos funciones. De todas formas, nuestros estudios nos permitieron identificar residuos específicos en la proteína de cápside que son requeridos para la producción de partículas virales infectivas, y que podrían ser usados para el diseño racional de virus atenuados.

Estudio sobre el requerimiento de residuos básicos de cápside necesarios para la producción de partículas infectivas en células de mosquito

El DENV cicla en la naturaleza entre humanos y mosquitos. Estos dos sistemas presentan grandes diferencias, sin embargo el virus ha desarrollado la capacidad de infectar y replicar eficientemente en ambos.

Con el fin de evaluar el rol de los residuos básicos presentes en $\alpha 3$ y $\alpha 4$ de cápside en la producción de partículas virales en células de mosquito, se transfectaron células C6/36 (provenientes de *Aedes albopictus*), con los ARNs de DV-R WT y de los 3 grupos de mutantes (Figura 30). De igual forma, en estos ensayos se tomaron los sobrenadantes de transfección y se los empleó para evaluar la producción de partículas infectivas (Figura 31).

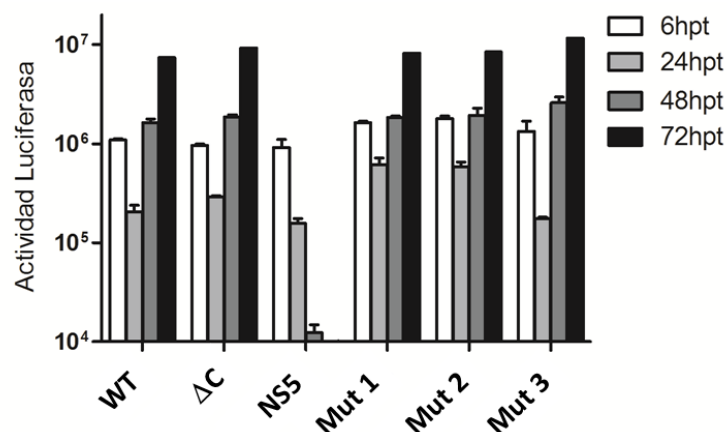


Figura 30. Transfección de células C6/36 con los ARN de DV-R del virus WT o mutantes.

En la Figura 30 se puede apreciar que en células C6/36 las mutaciones en cápside no afectan significativamente la traducción ni la replicación del ARN viral. Con respecto a los ensayos de infectividad, la actividad luciferasa post infección sugiere que no habría una disminución significativa en la producción de partículas infectivas en mosquito (Figura 31). Estos resultados fueron sorprendentes y sugieren que los requerimientos para la producción de partículas infectivas del DENV son marcadamente diferentes en células de mamífero y mosquito.

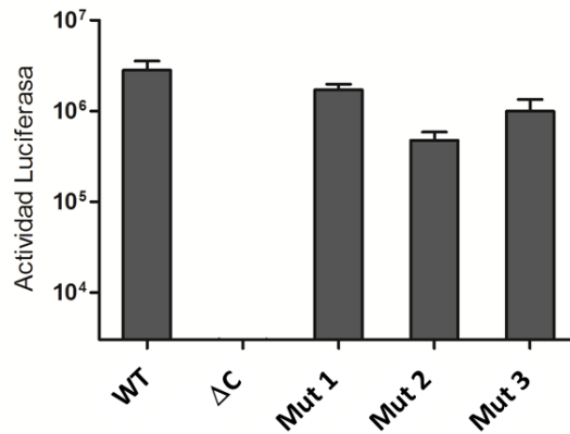


Figura 31. Ensayos de infectividad empleando sobrenadantes de células de mosquito transfectadas con ARNs de virus WT y mutantes.

Con el fin de analizar el impacto de las mutantes individuales que conforman las Mut 2 y Mut 3 en células de mosquito, transcripciones *in vitro* de las mutantes, en el contexto del DV-R, se transfectaron en células C6/36, y los sobrenadantes se emplearon en el ensayo de infectividad. Tal como se esperaba, las sustituciones no comprometieron la traducción ni replicación del genoma viral (Figura 32.A y Figura 33.A).

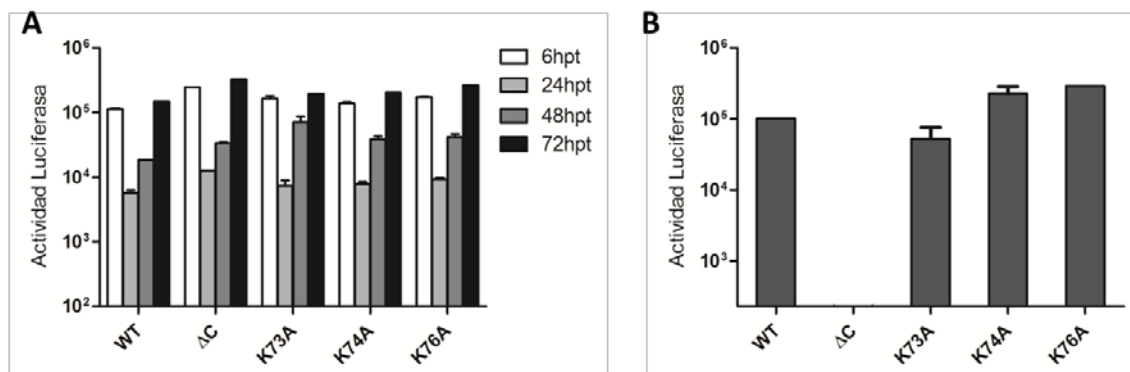


Figura 32. **A.** Transfección de células de mosquito con los ARN de DV-R del virus WT o mutantes individuales de Mut 2. **B.** Ensayos de infectividad con los sobrenadantes de 72 hpt obtenidos en las transfecciones presentadas en A.

En la Figura 32.B y la Figura 33.B se ve que las sustituciones individuales no comprometieron la producción de partículas infectivas presentes en los sobrenadantes obtenidos a partir de transfecciones en células de mosquito, confirmando el inesperado resultado observado con las mutaciones combinadas (Figura 31).

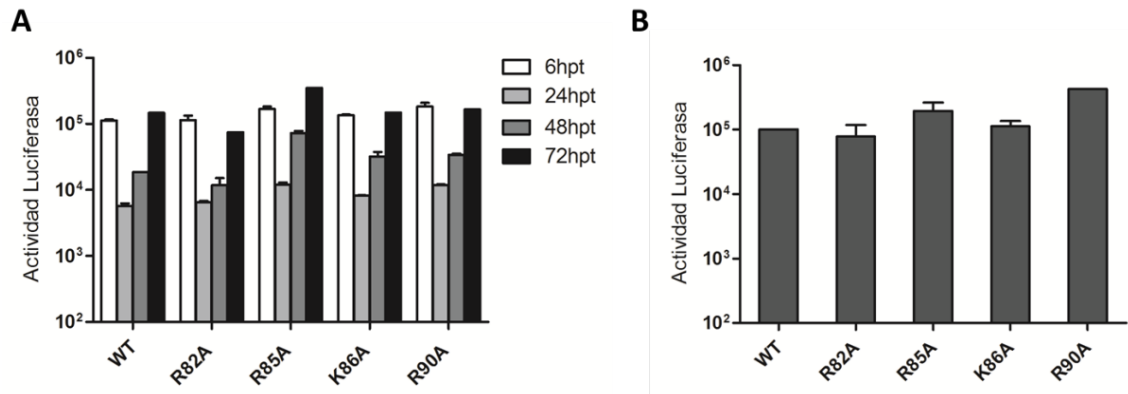


Figura 33. **A.** Transfección de células de mosquito con los ARN de DV-R del virus WT o mutantes individuales de Mut 3. **B.** Ensayos de infectividad con los sobrenadantes de 72 hpt obtenidos en las transfecciones presentadas en A.

Para caracterizar las propiedades de propagación las mutantes individuales y de a pares en células de mosquito, se realizaron IFIs en función del tiempo empleando anticuerpos específicos contra la proteína de envoltura viral en células C6/36 transfectadas; las mutantes fueron evaluadas en el contexto del clon infeccioso pD2/ICAflIII. Los resultados muestran que la propagación en células de mosquito se encuentra disminuida en las mutantes K73A, R85A, K73K74A y R85K86A (Figura 34), de manera similar a lo que se apreciaba en células de mamífero.

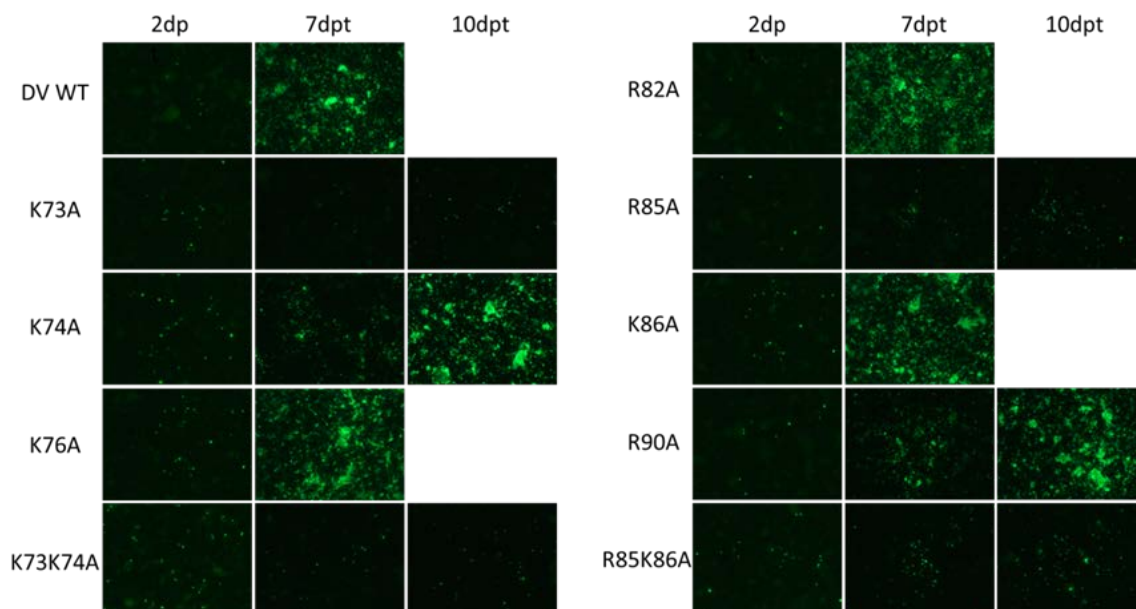


Figura 34. Inmunofluorescencias indirectas contra la proteína E de DENV que evidencian la propagación de los virus WT y mutantes en células de mosquito.

Esto resultó llamativo ya que en los ensayos de DV-R no se había detectado un defecto en la producción de partículas infectivas cuando los sobrenadantes de transfección de células de mosquito fueron evaluados en el ensayo de infectividad, en el cual se emplean células de mamífero (Figura 32.B y Figura 33.B).

En este sentido, es posible que en células de mosquito los virus con las mutaciones produzcan partículas que son infectivas en células de mamífero, pero no en células de mosquito. En resumen, dichas mutaciones en la proteína de cápside ocasionarían dos defectos distintos en células de mosquito y mamífero: en células de mamífero no se producirían las partículas virales, y en células de mosquito se producirían partículas virales que tendrían infectividad diferencial en mosquito y mamífero.

Con el fin de profundizar estos estudios y analizar las diferencias de infectividad de las partículas virales en células de mosquito y mamífero, se decidió re-evaluar los sobrenadantes provenientes de transfecciones de los virus reporteros, DV-R. Para ello, se analizó la infectividad de las partículas virales producidas en células de mosquito infectando nuevamente células de mosquito o de mamífero (Figura 35.A). Al analizar la presencia de partículas infectivas en los sobrenadantes de transfección de células de mosquito, lo que se manifestó fue una llamativa diferencia entre la infectividad viral en mamífero y mosquito (Figura 35.B y C).

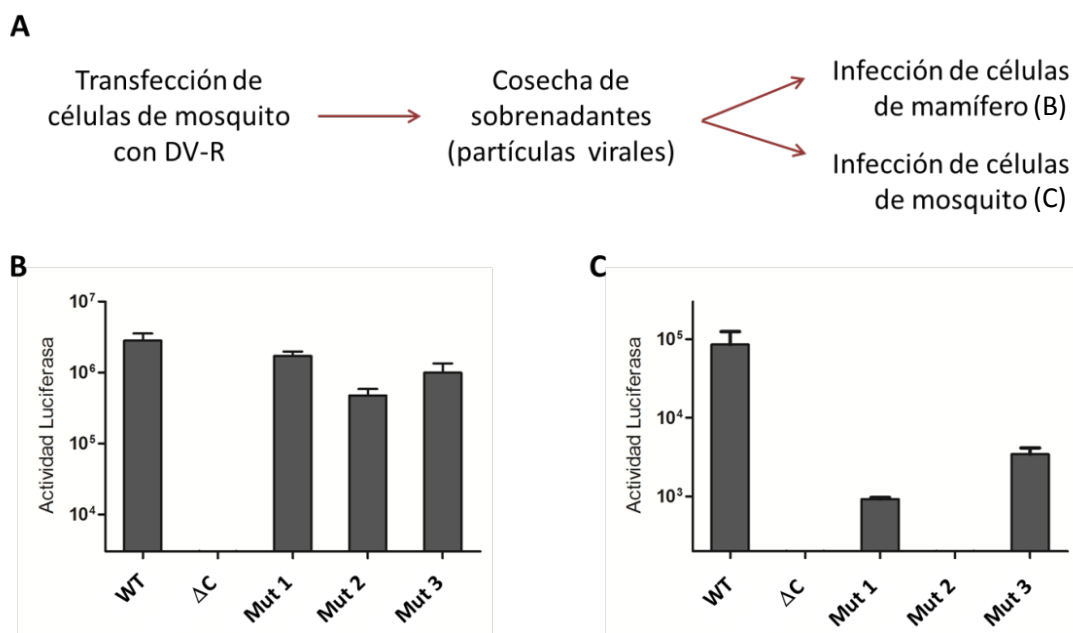


Figura 35. **A.** Esquema experimental. **B.** y **C.** Infección de células de mamífero (B) y mosquito (C) con los sobrenadantes de transfección provenientes de la Figura 30.

Al comparar los resultados se observa que mientras en células de mamífero las mutantes son altamente infectivas, en células de mosquito muestran una reducida infectividad, en concordancia con las observaciones hechas a través de IFIs (Figura 34). Esto indicaría que en células de mosquito se producen partículas virales, las cuales no serían infectivas en células de mosquito pero sí en células de mamífero, revelando un requerimiento diferencial de la proteína de cápside en células de mamífero y mosquito.

En conjunto, los resultados indican que mutaciones en la región $\alpha 4$ de cápside impiden la formación de partículas virales infectivas en células de mamífero, pero no en células de mosquito. Llamativamente, las partículas de los virus con mutaciones en cápside que se producen en células de mosquito son menos infectivas en células de mosquito que en células de mamífero, tal como indican los ensayos de virus reportero y las IFIs. Con respecto a las sustituciones individuales, la propagación de la mutante K73A se ve altamente disminuida con respecto al virus WT en ambas líneas celulares. Además, se detectó un requerimiento específico de la arginina 85 para la producción de partículas infectivas en células de mosquito.

De todos los residuos analizados, el de mayor relevancia en la propagación viral fue la lisina en la posición 73, ya que da lugar a un virus atenuado tanto en mosquito como en mamífero. Por este motivo se realizó un estudio más detallado acerca de las propiedades del virus con esta mutación puntual en la proteína cápside.

Caracterización de la mutante K73A

A continuación se decidió evaluar la causa del retraso en la propagación de la mutante con sustitución de la lisina 73 por alanina, para lo cual se hicieron transfecciones de células de mamífero y mosquito con el virus WT y mutante y se siguió la infección por IFI a tiempos largos. La Figura 36 muestra que si bien la propagación de la mutante K73A está impedida en células de mosquito y mamífero, existe un bajo nivel de señal positiva en transfecciones con el ARN viral K73A en células en cultivo, aun luego de 12 días post transfección.

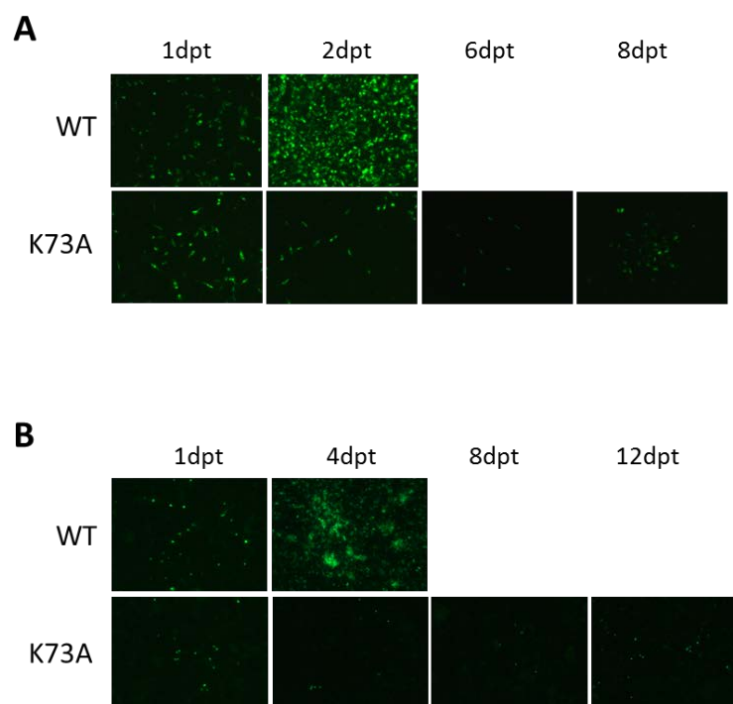


Figura 36. Inmunofluorescencias indirectas contra la proteína E de DENV en función de los días post transfección en **A.** Células de mamífero. **B.** Células de mosquito.

Para determinar si se producen partículas virales no infectivas o se produce una cantidad muy baja de partículas virales, se cuantificaron componentes de los viriones en el medio extracelular. En la Figura 37.A se observa que la mutante K73A libera proteína de cápside al medio extracelular, aunque en menor cantidad en comparación al virus WT. Para confirmar este resultado se decidió cuantificar también el genoma viral en sobrenadantes celulares. Dado que el ARN viral es degradado en el medio extracelular si no se encuentra protegido dentro de la partícula del virus, se realizaron ensayos de PCR cuantitativas en tiempo real de sobrenadantes celulares. Los

resultados acerca de la cantidad de genoma de DENV extracelular, presentados en la Figura 37.B, son consistentes con los datos obtenidos para la proteína de cápside: la mutante K73A produce aproximadamente 10 veces menos partículas que el virus WT.

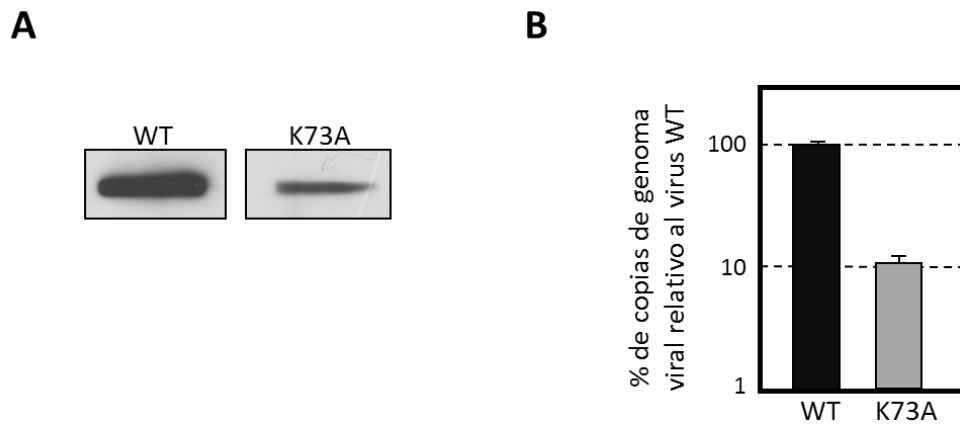


Figura 37. Comparación de la cantidad de partículas virales WT y K73A liberadas al medio extracelular en células de mamífero. A. Cuantificación a través de slot blot de la proteína de cápside en el medio extracelular. B. Cuantificación a través de PCR en tiempo real del genoma viral extracelular.

Estos resultados indican que la mutante K73A produce partículas virales, aunque en menor cantidad que el virus WT. Sin embargo, los datos obtenidos a través del virus reportero indicaban una diferencia de aproximadamente 500 veces en infectividad entre K73A y WT, es por ello que se concluye que esta mutante no sólo libera menos partículas virales al medio extracelular, sino que las mismas son menos infectivas.

Luego, se decidió evaluar si el defecto en propagación de la mutante K73A se debe a que se requiere una carga positiva en esa posición o si se necesita específicamente una lisina. Para realizar este análisis se utilizó nuevamente el DV-R, pero en lugar de sustituir a la lisina 73 por alanina, la misma se reemplazó por arginina (Figura 38).

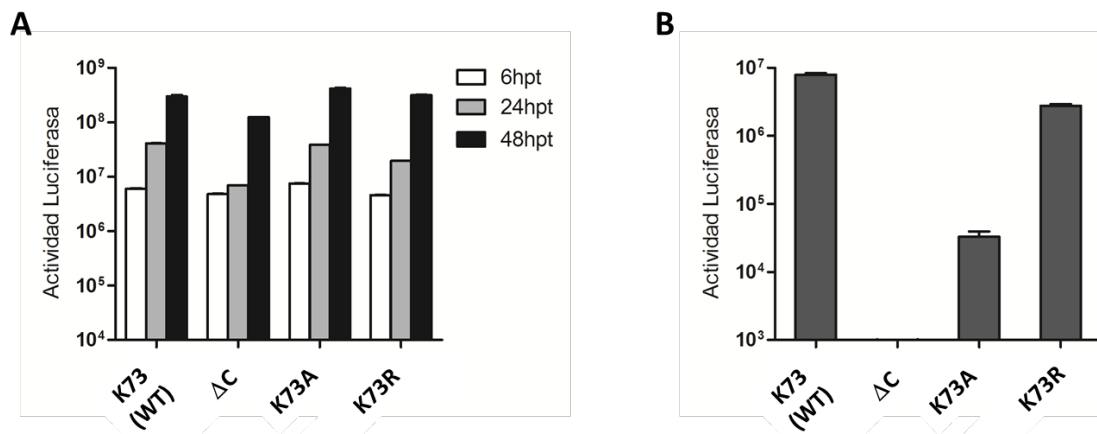


Figura 38. **A.** Transfección de células de mamífero con los ARN de DV-R del virus WT o mutantes de K73. **B.** Infección de células de mamífero con los sobrenadantes de 48 hpt obtenidos en las transfecciones presentadas en A.

Los resultados indican que al mantener la carga positiva en la posición 73 se recupera en gran medida la infectividad; sin embargo la presencia de arginina en esa posición no logra restablecer los niveles de infectividad obtenidos con el DV-R WT (5 veces de diferencia). De esta forma, se puede concluir que la carga positiva en dicha posición cumple un rol importante, pero habría una función que depende de la identidad del aminoácido.

La llamativa diferencia que se observa entre la producción de partículas virales en la mutante K73A (Figura 37.A) y la infectividad de las mismas (Figura 38.B) nos permite concluir que dicho cambio ocasiona un problema durante la infección. Esto es llamativo porque la cápside se encuentra dentro del virión y no estaría involucrada en la interacción con el receptor celular y la endocitosis. Por ende se decidió estudiar qué defecto podría presentar la mutante K73A durante el proceso de infección. Para ello, se infectaron células de mamífero con sobrenadantes provenientes de transfecciones con los virus WT y K73A. Luego de 1 hora de infección, se cosecharon las células y se analizó la adsorción de partículas virales mediante western blots contra la proteína de cápside (Figura 39).

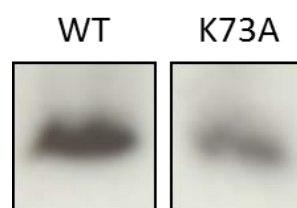


Figura 39. Western blot de extractos de células BHK infectadas durante 1 hora con sobrenadantes de 48 hpt producidos en la misma línea celular.

Los resultados indican que las partículas del DENV ensambladas con proteínas de cápside que contienen la mutación K73A pueden unirse a una nueva célula (Figura 39), pero no producen una infección productiva (Figura 36). Debido a que la adsorción de la partícula ocurre eficientemente, es probable que exista algún defecto durante la internalización del virus, pero es más probable que el defecto este debido a un problema en el desnudamiento del ARN viral. Este último es el proceso por el cual la proteína de cápside libera al genoma para dar lugar al inicio de la traducción del virus. Detalles del desnudamiento del DENV se presentan en el Capítulo 3 de esta Tesis.

DISCUSIÓN CAPÍTULO 1

El mecanismo por el cual la proteína de cápside recluta al genoma viral durante la encapsidación es una de las etapas más oscuras del ciclo de replicación de los flavivirus. En este capítulo se investigaron requerimientos estructurales y se describió el rol de los aminoácidos básicos de la proteína de cápside durante la morfogénesis del DENV.

La proteína de cápside posee 26 aminoácidos básicos de los 100 residuos totales, los cuales están principalmente ubicados en las regiones N-terminal desestructurada y $\alpha 4$. Es posible que la región aquí estudiada interactúe directamente con el genoma viral. Para KUNV, experimentos *in vitro* demostraron que los primeros 32 y los últimos 26 residuos de la proteína de cápside pueden unir con alta afinidad al ARN viral (Khromykh and Westaway, 1996). En este sentido, los resultados presentados en esta sección demuestran que las cargas positivas en la región $\alpha 4$ de cápside son importantes para la propagación viral, tanto en células de mosquito como de mamífero en cultivo. Sin embargo, se vio que en general no son necesarios residuos básicos en posiciones definidas para que haya propagación viral en células en cultivo. El requerimiento sería más bien de una cierta densidad de carga en la región de la $\alpha 4$, la cual se compromete al sustituir al menos dos residuos básicos simultáneamente. Un hallazgo importante es el estricto requerimiento de una carga positiva en la posición 73 de la proteína de cápside. En este sentido, la propagación viral se ve seriamente comprometida en células de mamífero y mosquito infectadas con virus que tienen dicho residuo mutado por alanina.

Con respecto a la dimerización a través de $\alpha 4$, estudios recientes reportaron a la interfase de la región $\alpha 4$ - $\alpha 4'$ como fundamental para la estabilidad de cápside y la formación de nucleocápsides en DENV-2. Los autores de dicho trabajo describieron que sustituciones de los residuos hidrofóbicos internos de $\alpha 4$, I78, L81 y L92 por aminoácidos hidrofílicos perturban la estabilidad del dímero de cápside afectando el plegamiento y estabilidad de la proteína, e impidiendo como consecuencia la formación de nucleocápsides (Teoh et al., 2014). Nuestros resultados indican que las

Tesis identifica por primera vez el requerimiento de una carga positiva en cápside en una posición específica para la propagación viral.

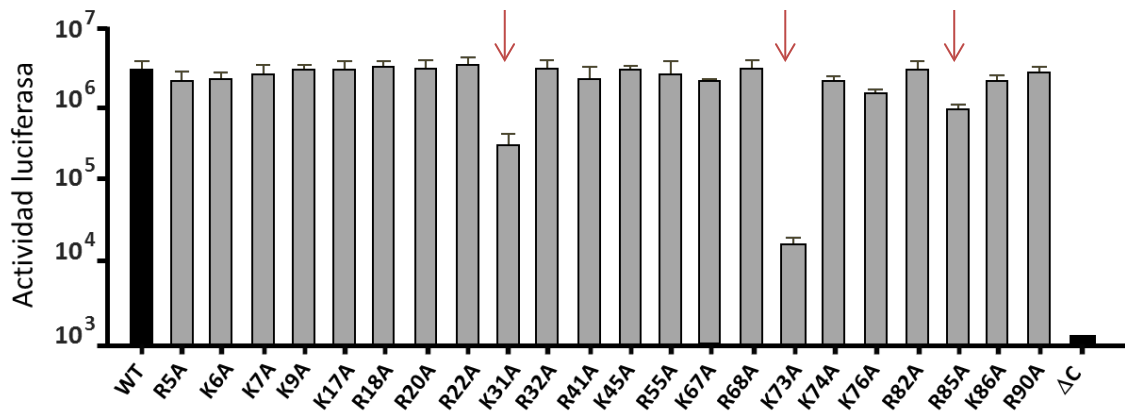


Figura 41. Infectividad de las mutantes individuales en células de mamífero. Las flechas rojas marcan las 3 posiciones (K31, K73, R85) que al ser sustituidas por alanina presentan el mayor impacto en infectividad en células de mamífero.

La proteína de cápside posee tres NLS predichas en su secuencia, las cuales involucran a los residuos KKAR (aminoácidos 6-9), KKSK (aminoácidos 73-76) y un NLS bipartito, RKEIGRMLNILNRRRR (aminoácidos 85-100). Es importante destacar que todos estos NLS están conformados en gran medida por residuos básicos. Si bien se mutaron las posiciones K73, K74 y K76 del NLS comprendido entre los residuos 73-76, únicamente la mutante K73A produjo una disminución de la acumulación de cápside en nucléolos, así como también en la producción de partículas infectivas. Por ende, los resultados obtenidos no permiten descartar que la localización nuclear de cápside sea requerida para la producción eficiente de partículas virales infectivas. Sin embargo, cabe destacar que la carga positiva en la posición 73 podría tener una función importante en el proceso de infección, en el cual no sería relevante la localización nuclear.

Por otro lado, es posible que un residuo básico en la posición 73 sea necesario para la interacción con una proteína, ya sea viral o celular, o que sea importante para la adecuada interacción con el genoma viral. Es particularmente interesante que el rol y requerimiento de un residuo básico en dicha posición sea diferente para la producción de partículas en células de mosquito y mamífero, mientras que en ambos tipos celulares sea importante para la propagación viral.

Las células de mosquito y mamífero poseen distintas temperaturas óptimas de crecimiento (33°C y 37°C respectivamente), además de tener contextos celulares diferentes (proteínas, sistemas de defensa, etc.). Entre las hipótesis que permiten explicar el requerimiento diferencial de la posición 73 podrían mencionarse una estabilidad diferencial de la proteína de cápside a distintas temperaturas, la necesidad de chaperonas distintas para el correcto plegado de la proteína, y/o la utilización de factores del hospedador diferentes durante el proceso de encapsidación, entre otros.

Los resultados presentados en la Figura 39 sugieren que la K73 podría cumplir algún rol importante durante el proceso de desnudamiento del genoma viral, ya sea por el requerimiento de un cambio conformacional en cápside, o a través de la interacción con algún factor celular para la correcta liberación del ARN viral. Estos resultados abren nuevos interrogantes sobre el proceso de desnudamiento del DENV que se abordarán en el Capítulo 3 de la presente tesis.

Finalmente, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio identificaron que la proteína viral NS3 está involucrada en el proceso de formación de partículas virales del DENV (Gebhard et al., 2016). Por otro lado, los factores virales NS1 y NS2A también fueron hallados relevantes para el correcto ensamblado de partículas virales (Scaturro et al., 2015, Wu et al., 2015, Xie et al., 2015). Estos reportes indican que existen varias proteínas virales, así como también factores celulares que están involucradas en el complejo proceso de encapsidación; es muy probable que este proceso sea diferente en cuanto a factores y requerimientos en células de mosquito y de mamífero.

En resumen, nuestros resultados nos permitieron identificar residuos básicos específicos en la proteína de cápside que son cruciales para la propagación viral. Además, pudimos determinar requerimientos diferenciales en cápside durante la producción de partículas virales en células de mosquito y mamífero en cultivo.

CAPÍTULO 2. Estudiar propiedades bioquímicas de la proteína de cápside por medio de espectrometría de masa

Purificación de la proteína de cápside de DENV

Estudios previos realizados en el laboratorio revelaron una movilidad electroforética diferente entre la proteína de cápside de DENV proveniente de viriones o de células infectadas. A partir de esta observación, se decidió investigar si cápside podría estar siendo modificada post-traduccionalmente.

Con el fin de estudiar propiedades bioquímicas de la proteína de cápside se diseñó un método de purificación aprovechando la alta afinidad de la misma por la heparina. Esto permitió aislar a cápside producida durante la infección viral sin la necesidad de incorporarle un *tag*. La proteína se purificó a partir de extractos de células infectadas y también de virus liberados al medio extracelular (Figura 42).

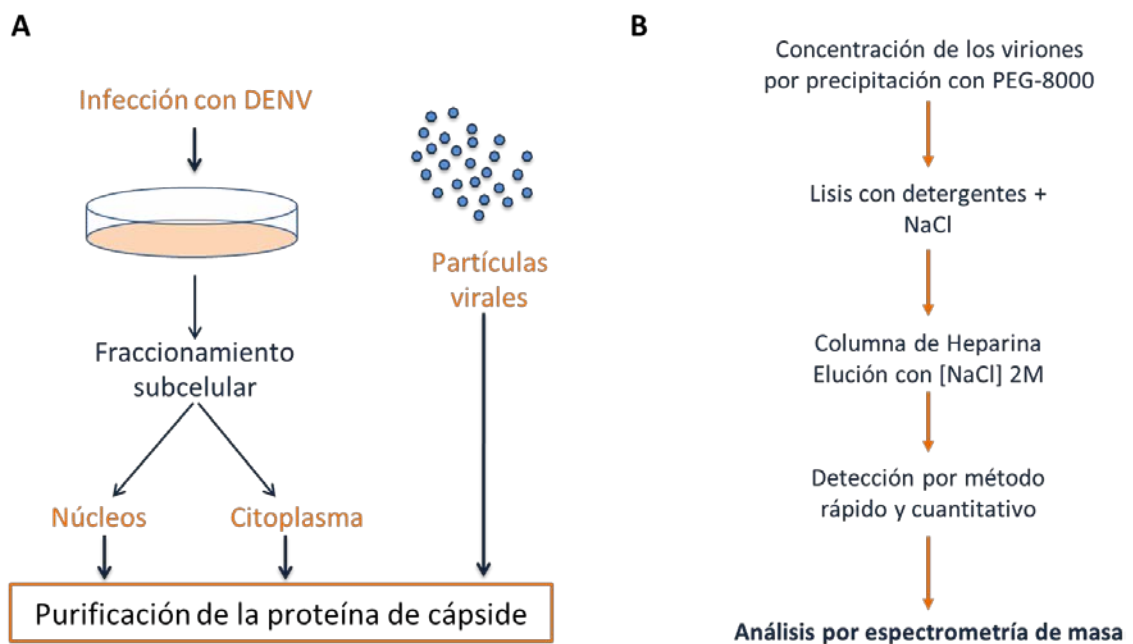


Figura 42. **A.** Esquema experimental general. **B.** Protocolo de aislamiento, cuantificación y análisis de cápside proveniente de partículas virales.

Para evaluar cuantitativamente el método de purificación, posteriormente a la etapa de cromatografía de afinidad con heparina, se realizó una cuantificación por dot blot haciendo uso de una curva de calibración con cápside recombinante (Figura 43). La cuantificación indicó que obtuvimos aproximadamente 2 μ g de proteína de cápside de cada preparación, en las condiciones empleadas.

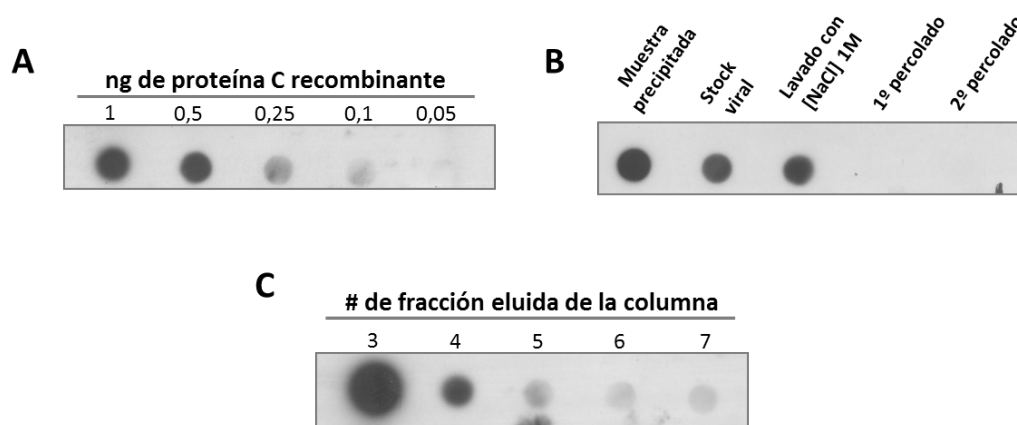


Figura 43. Ejemplos de dot blot revelados contra la proteína de cápside. **A.** Curva de calibración con proteína de cápside recombinante. **B.** Análisis de las distintas etapas del proceso de aislamiento. **C.** Cuantificación de distintas fracciones de muestra eluidas de la columna de heparina.

Estudio de la existencia de modificaciones post-traduccionales en cápside aislada de virus producidos en células de mosquito

Una vez purificada la proteína de cápside de partículas virales producidas en células de mosquito, se analizó la presencia de modificaciones post-traduccionales (PTMs) mediante las técnicas de espectrometría de masa (MALDI-TOF MS/MS), y cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masa (nano LC-MS/MS). Este trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Rosario Durán, de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, perteneciente al Instituto Pasteur de Montevideo, y fue llevado a cabo durante 3 pasantías cortas en el año 2012. Se identificaron 2 tipos de modificaciones en la proteína aislada de viriones: fosforilaciones en serinas y treoninas y acetilaciones en lisinas. Los residuos T11, S24 y S34 se encontraron fosforilados, mientras que las K31 y K76 se hallaron acetiladas, tal como se esquematiza en la Figura 44.



Figura 44. PTMs halladas en la proteína de cápside aislada de partículas virales producidas en células de mosquito.

Este resultado fue llamativo ya que nunca antes se habían reportado acetilaciones para ningún otro flavivirus. Es interesante destacar que la acetilación de lisinas transforma un grupo amina en una amida, modificando la carga del aminoácido y consecuentemente de la proteína. Más aun, las fosforilaciones de serinas y treoninas también modifican la carga de cápside, disminuyendo la densidad positiva de la proteína. Por ende, ambas modificaciones en cápside podrían funcionar como moduladores de la afinidad por el genoma del virus. Es importante destacar que las acetilaciones y fosforilaciones fueron halladas en una fracción minoritaria de proteína de cápside, sugiriendo también una actividad moduladora.

Con el objetivo de confirmar las modificaciones halladas en la proteína por espectrometría de masa, se realizaron western blot utilizando muestras de cápside purificada de viriones y empleando anticuerpos anti-lisina acetilada y anti-serina fosforilada (Figura 45).

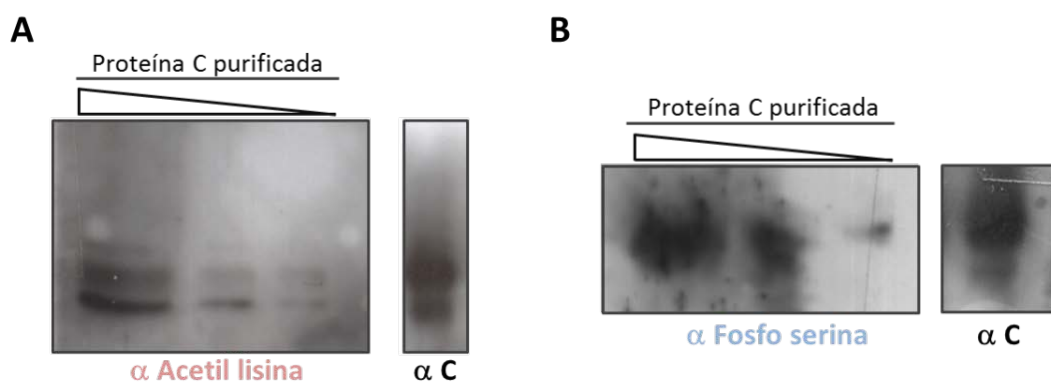


Figura 45. Western blots de purificaciones de proteína de cápside de partículas virales producidas en células de mosquito. **A.** Membrana revelada con anti-acetil lisina (panel izquierdo, calles sembradas con cantidades decrecientes de muestra) y anti-cápside (panel derecho). **B.** Membrana revelada con anti-fosfo serina (panel izquierdo, calles sembradas con cantidades decrecientes de muestra) y anti-cápside (panel derecho).

Los resultados de este análisis muestran que la proteína es reconocida por dichos anticuerpos, confirmando las PTMs halladas por espectrometría de masa.

Estudio de la existencia de PTMs en cápside aislada de fracciones citoplasmáticas de células de mosquito y mamífero infectadas

A continuación, se realizaron fraccionamientos subcelulares de células de mosquito y mamífero infectadas utilizando un medio hipotónico en presencia de detergentes. Los extractos citoplasmáticos se trataron con DNAsas y RNAsas y fueron pasados por columnas de afinidad. El análisis de espectrometría de masa de la proteína purificada indicó la presencia de lisinas dimetiladas y serinas fosforiladas en cápside aislada de citoplasma de células infectadas tanto de mosquito como de mamífero. Las posiciones de dichas PTMs se encuentran indicadas en la Figura 46.



Figura 46. PTMs halladas en la proteína de cápside aislada de citoplasma de células de mosquito y mamífero.

Este resultado es interesante ya que no sólo indica la presencia de lisinas dimetiladas, no reportadas hasta el momento, sino también que las metilaciones son seleccionadas negativamente durante la encapsidación, dado que dicha modificación no se observa en las proteínas de cápside purificadas de las partículas virales. Además, dos lisinas que sufren dimetilaciones, K31 y K76, también habían sido halladas acetiladas, pudiendo funcionar tal vez como una forma de regulación, ya sea de localización subcelular, interacción con factores celulares y/o virales, genoma viral, entre otras posibilidades. Los residuos que se identificaron fosforilados (S24 y S34) también habían sido encontrados modificados en cápside aislada de partículas virales, con la excepción de la T11 (comparar Figura 44 y Figura 46). Al igual de lo que ocurre para la proteína

purificada de viriones, en este caso también cabe destacar que las dimetilaciones y fosforilaciones fueron halladas en una fracción minoritaria de proteína de cápside.

Estudio de la existencia de PTMs en cápside aislada de virus producidos en células de mamífero y en fracciones nucleares de células de mosquito y mamífero infectadas

El análisis de las muestras provenientes de stock viral de células de mamífero y de fracciones nucleares de mosquito y mamífero se vio dificultado por diferentes motivos. En el primer caso, el título viral alcanzado en células de mamífero no fue suficiente para poder obtener la masa de proteína de cápside necesaria para ser evaluada por espectrometría de masa. En el caso del análisis de las fracciones nucleares, el inconveniente fue la presencia de histonas en la muestra, las cuales poseen un punto isoeléctrico y tamaño muy similar a cápside. Además, las mismas presentan alta afinidad por heparina y son mucho más abundantes en esta fracción subcelular que la proteína viral, dificultando así la purificación y detección de cápside en la muestra. En relación a esto, en el laboratorio nos encontramos desarrollando nuevos métodos de purificación de cápside, incluyendo afinidad por anticuerpos y separación de proteínas a través de geles en 2 dimensiones.

Es interesante mencionar que en la literatura se ha reportado que la proteína de cápside de DENV se une a histonas inhibiendo así la formación de nucleosomas (Colpitts et al., 2011). Esto podría ser una causa adicional en la dificultad de separar a cápside de las histonas en las fracciones nucleares.

Relevancia funcional de los residuos de cápside modificados post-traduccionalmente

A continuación se evaluó la posible función de las PTMs halladas en cápside, durante la replicación y encapsidación del genoma viral en células en cultivo. Para ello, se sustituyeron los residuos que se encontraron modificados por aminoácidos no susceptibles a las modificaciones encontradas, y se los analizó en el contexto del clon infeccioso del virus reportero, DV-R.

En la Figura 47.A se muestra la transfección en células de mamífero de los ARNs de las mutantes individuales por alanina para sitios de fosforilación, T11A, S24A, S34A y la mutante triple T11S24S34A.

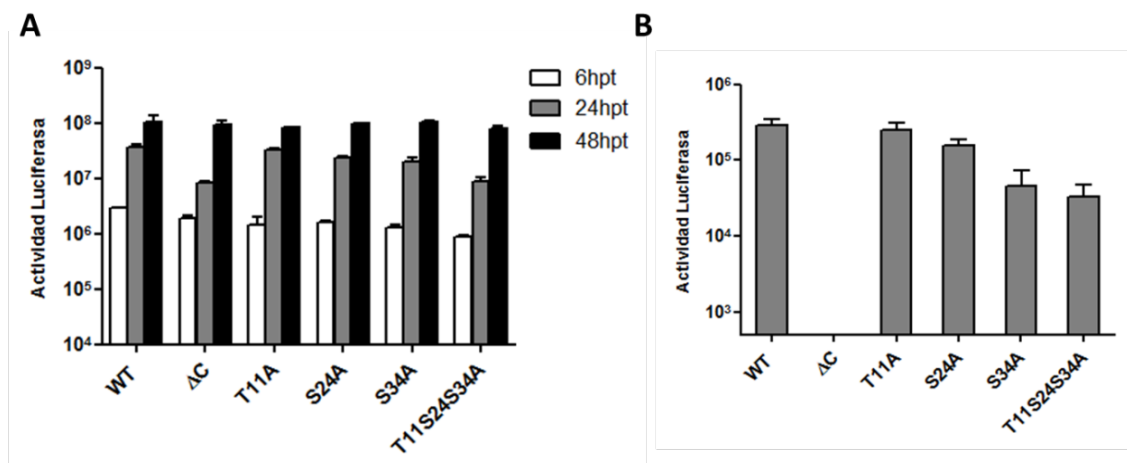


Figura 47. **A.** Transfección de células BHK con los ARN de DV-R del virus WT o mutantes de sitios de fosforilación. **B.** Infección con los sobrenadantes de 48 hpt obtenidos en las transfecciones presentadas en A.

Como era esperado, ninguna de las mutaciones introducidas en cápside afectó la traducción ni la replicación del genoma viral en células de mamífero. Al analizar la producción de partículas infectivas, se ve que la sustitución individual de los residuos T11 o S24 no alteró significativamente la infectividad del virus reportero. Sin embargo, al analizar qué sucede al remplazar la S34 por alanina, se ve que dicha mutación genera un defecto en la producción de partículas virales y/o en la infectividad de las mismas. Además, los niveles de propagación de la mutante triple, T11S24S34A, también reflejaron este defecto (Figura 47.B). Estos resultados indican que la fosforilación de la serina 34 podría ser relevante para la propagación de DENV en

células de mamífero en cultivo. Sin embargo, no se puede descartar un efecto del cambio del aminoácido en la estructura de la proteína.

Con el fin de evaluar el posible rol de las dimetilaciones, se sustituyó cada una de las lisinas identificadas, K9, K31, K67 y K76 por alanina. Se evaluó también una mutante de cápside con las 4 posiciones sustituidas simultáneamente. Los ARNs generados *in vitro* con las mutaciones incorporadas en el DV-R fueron transfectados en células de mamífero en cultivo y se midió la actividad luciferasa en función del tiempo post transfección. Estos valores permiten confirmar que ninguna mutación evaluada en el experimento afecta la traducción ni la replicación del genoma viral (Figura 48.A).

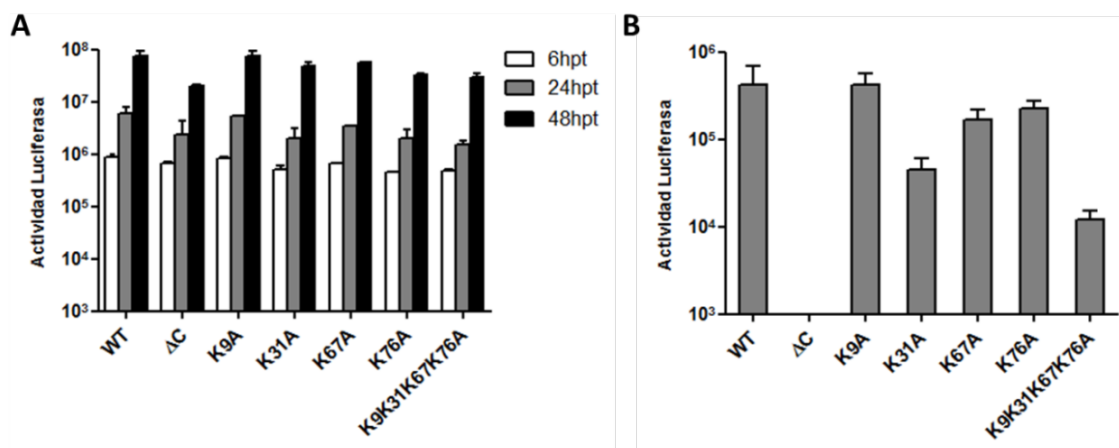


Figura 48. **A.** Transfección de células BHK con los ARN de DV-R del virus WT o mutantes de sitios de dimetilación. **B.** Infección con los sobrenadantes de 48 hpt obtenidos en las transfecciones presentadas en A.

El estudio del efecto en la propagación del virus de las sustituciones que impiden la metilación de las lisinas indica que la sustitución K9A no afecta la propagación del virus, tal como ya se había reportado previamente (Samsa et al., 2012) (Figura 48.B). Sin embargo, las mutaciones K67A y K76A ocasionan una reducción de aproximadamente 3-5 veces en la infectividad, y la sustitución de la posición K31 por alanina disminuye 10 veces la infectividad del DV-R. Por último, se ve que la mutante quádruple disminuye más de 50 veces la producción de partículas infectivas. Esto puede deberse a que las dimetilaciones son importantes para la propagación del virus, pero es también posible que dicha reducción se encuentre dada, al menos en parte, por estar eliminando cargas positivas involucradas en la interacción con el ARN viral.

Con el fin de discernir el efecto ocasionado por el cambio de cargas, y también para evaluar el rol de las acetilaciones identificadas por espectrometría de masa, se sustituyeron las lisinas K31 y K76 por argininas (Figura 49). Estas sustituciones por residuos cargados positivamente no afectan la carga global de la proteína de cápside.

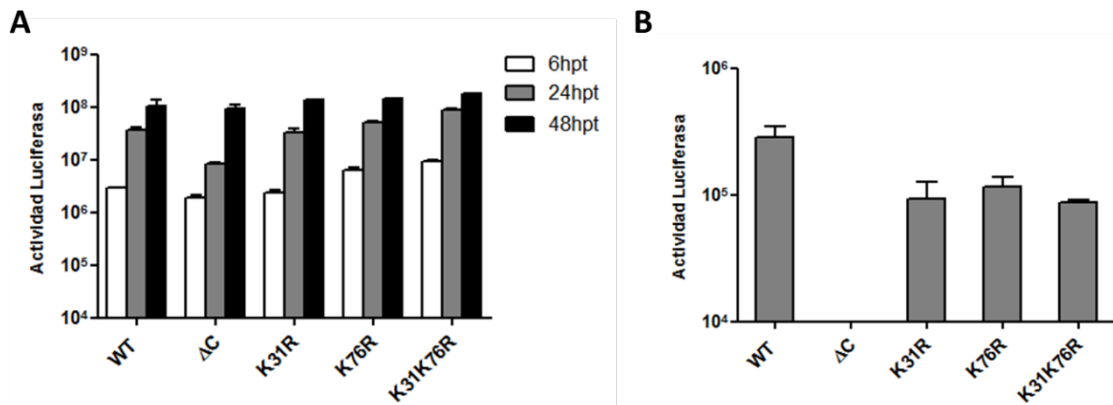


Figura 49. **A.** Transfección de células BHK con los ARN de DV-R del virus WT o mutantes de sitios de acetilación. **B.** Infección con los sobrenadantes de 48 hpt obtenidos en las transfecciones presentadas en A.

Los resultados de este experimento indican que tanto las sustituciones individuales como la doble mutante K31K76R presentan un defecto en la producción de partículas infectivas en células de mamífero (Figura 49).

En particular, al reemplazar la K31 por arginina, es muy interesante notar que si bien se recuperan parcialmente los niveles de propagación que se veían afectados en la mutante K31A, la mutante K31R no alcanza los niveles de infectividad del virus WT (disminución de 5 y 10 veces respectivamente con respecto al DV-R WT, Figura 49.B y Figura 48.B). En relación a la lisina 76, si bien el defecto en infectividad que se aprecia en K76A es leve (5 veces), este tampoco se recupera en la mutante K76R, sugiriendo que la PTM de dicho residuo podría cumplir un rol durante la propagación del virus. En conclusión, estos resultados sugieren que la acetilación y/o dimetilación de los residuos K31 y K76 cumple un rol en la regulación de la producción de partículas infectivas de DENV.

DISCUSIÓN CAPÍTULO 2

En este capítulo se describió la identificación de PTMs en la proteína de cápside del DENV. Las PTMs fueron halladas en proteína aislada de partículas virales producidas en células de mosquito y de citoplasma de células de mamífero y mosquito en cultivo. Este es el primer trabajo que describe que la proteína de cápside sufre PTMs durante la infección con DENV.

Uno de los resultados más llamativos presentados en este capítulo es el hallazgo de diferentes PTMs en la proteína de cápside que se encuentra en partículas virales y en células infectadas. Esto significa que las proteínas dimetiladas son excluidas durante el proceso de encapsidación, o que las proteínas acetiladas se seleccionan positivamente durante dicho proceso. Si bien aún no conocemos el mecanismo que lleva a esta selección, una posibilidad podría ser que las proteínas dimetiladas se encuentren en compartimentos subcelulares no accesibles durante la encapsidación. Alternativamente, podría ser que las modificaciones regulen la interacción con factores que estimulen/inhiban la incorporación de una subpoblación particular de cápside en la partícula viral. Podría ocurrir también que las partículas virales con cápside parcialmente acetilada liberen más fácilmente al genoma viral, otorgándoles así una ventaja durante el desnudamiento.

Si bien estos son, a nuestro saber, los primeros resultados que muestran experimentalmente que existen PTMs en cápside de un Flaviviridae, trabajos previos ya habían sugerido a través de bioinformática que proteínas homologas a cápside, de WNV y HCV, podrían ser blancos de fosforilaciones (Bhuvanankantham et al., 2010, Cheong and Ng, 2011, Lanford et al., 1993, Lu and Ou, 2002, Shih et al., 1995). En el caso de WNV, se propuso a la proteína kinasa C (PKC) como la posible responsable de la fosforilación de cápside, y se sugirió que esta modificación podría influenciar el tráfico nuclear de cápside al modular la eficiencia de unión a importina- α (Bhuvanankantham et al., 2010). Con respecto a la proteína core de HCV, se propuso que la misma podría ser fosforilada por PKA y también por PKC, y que una de las funciones de esta PTM sería la de regular la localización nuclear de la proteína (Lanford

et al., 1993, Lu and Ou, 2002, Shih et al., 1995). En el caso de cápside de DENV, nuestros análisis de predicción bioinformática también sugieren a PKC como un posible factor involucrado en la fosforilación de la proteína, sin embargo, más estudios serían necesarios para confirmar esta predicción.

Estudios previos analizaron el posible rol de la fosforilación de cápside de WNV (Cheong and Ng, 2011). En ese trabajo, los sitios putativos de fosforilación de la proteína fueron mutados para impedir dicha modificación. Los resultados sugirieron que la fosforilación atenuaría la capacidad de cápside para unir ARN, y que las mutaciones introducidas estarían afectando la dimerización de la proteína. Además, sugirieron que la hipofosforilación de cápside reduciría su localización nuclear. Teniendo en cuenta que tanto para core de HCV como cápside de WNV se postula una disminución en la localización nuclear al mutar los sitios putativos de fosforilación, sería interesante estudiar si las PTMs halladas en la proteína de DENV están involucradas en la localización subcelular de la proteína.

La proteína de cápside de los flavivirus presenta muchas semejanzas con las histonas celulares. Entre estas similitudes se pueden mencionar un bajo peso molecular, elevado punto isoeléctrico, N-terminal desestructurado, alta afinidad por ácidos nucleicos y función de compactación del genoma. Estudios previos han relacionado a la proteína de cápside de DENV con histonas. Al respecto, se vio que dicha proteína viral tiene la capacidad de unir a H2A, H2B, H3 y H4. Además, se describió colocalización nuclear y citoplasmática entre histonas y cápside durante la infección. Los autores propusieron que cápside actuaría imitando histonas, formando heterodímeros con las mismas en el núcleo, uniendo ADN e impidiendo la formación de nucleosomas (Colpitts et al., 2011). Llamativamente, se vio que la infección con DENV altera los niveles de H2A fosforilada (Colpitts et al., 2011).

Es sabido que las histonas sufren una gran cantidad de PTMs, entre las cuales se encuentran la acetilación de lisinas, metilación de lisinas y argininas, ubiquitinación de lisinas, sumoilación de lisinas, isomerización de prolinas, y fosforilación de serinas, treoninas y tirosinas, entre otras. Estas PTMs tienen la capacidad de regular la función y estructura de la cromatina. Si bien la mayoría se encuentra en los extremos N-

terminal desestructurado, y C-terminal, un número significativo de PTMs también ocurre en el dominio central de las histonas, modificando las interacciones histona-histona e histona-ADN (Rothbart and Strahl, 2014). Dada la gran similitud de cápside con las histonas, es posible que estas proteínas compartan propiedades funcionales frente a las PTMs, como por ejemplo la regulación de la interacción con ácidos nucleicos.

Las PTMs halladas en la proteína de cápside de DENV, tanto en la que se encuentra en partículas virales como en el citoplasma de células infectadas, no se detectaron en todas las moléculas de cápside, ya que en todos los casos se identificaron también los mismos péptidos sin las modificaciones reportadas. Esto también es similar a lo que se aprecia en histonas, en donde las modificaciones son dinámicas y parciales, actuando como moduladores de interacciones.

En la actualidad hay cada vez más información acerca de reguladores de epigenética de histonas (principalmente acerca de deacetilasas de histonas) y su rol en cáncer, enfermedades neurológicas y desordenes inmunes (Falkenberg and Johnstone, 2014). Sería muy interesante aprovechar las herramientas que se están desarrollando en este campo para evaluar su potencial uso en el marco de la infección con DENV. Esto nos ayudaría a comprender mejor qué rol cumplen las PTMs en cápside, pudiendo surgir de aquí inhibidores que puedan emplearse como estrategias antivirales.

CAPÍTULO 3. Estudiar el proceso de desnudamiento del genoma del DENV

El DENV ingresa a la célula hospedadora a través de endocitosis mediada por receptor. A medida que el endosoma madura, el pH del mismo se acidifica y se generan cambios conformacionales en la proteína E, los cuales gatillan la fusión entre las membranas del virus y el endosoma (Figura 50). Esta fusión resulta en la liberación de la nucleocápside al citoplasma celular, en donde el genoma del virus es traducido.

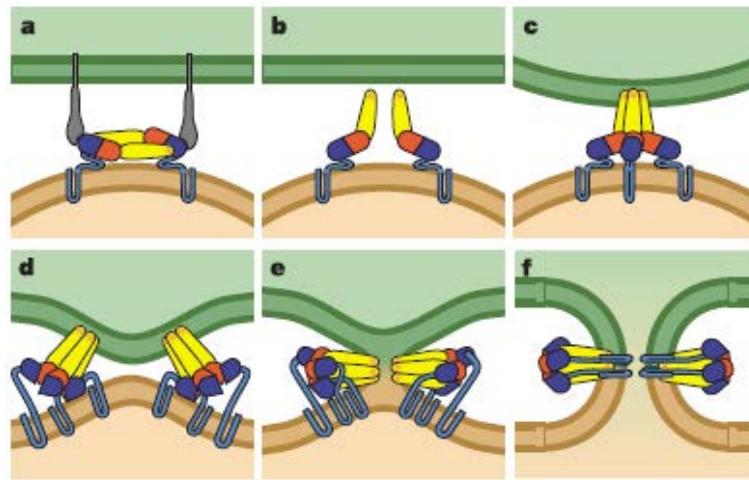


Figura 50. Mecanismo propuesto de fusión de membranas. La proteína E está representada con las regiones stem y transmembrana en azul. A. E se une al receptor en la superficie celular y el virion es internalizado en un endosoma. B. El pH ácido del endosoma causa que la proteína E se reacomode exhibiendo el péptido de fusión y permitiendo que los monómeros de E se reorganicen. C. El péptido de fusión es insertado en la membrana del hospedador, promoviendo la trimerización de E. D. Los contactos se extienden desde el péptido de fusión, en la punta del trímero, hasta la base mismo, generando un reordenamiento que causa que se doblen las membranas. E. El surgimiento de nuevos contactos en el trímero lleva en primer lugar a hemifusión y luego, F. a la formación de un poro de fusión lipídica (Modis et al., 2004).

El desnudamiento es el proceso mediante el cual la proteína de cápside libera al genoma viral para su traducción por la maquinaria celular. Cómo la proteína de cápside es removida del genoma de ARN, y cómo el genoma es liberado para permitir la síntesis proteica durante el inicio de la infección son procesos que aún no han sido estudiados para el DENV y otros flavivirus (Figura 51).

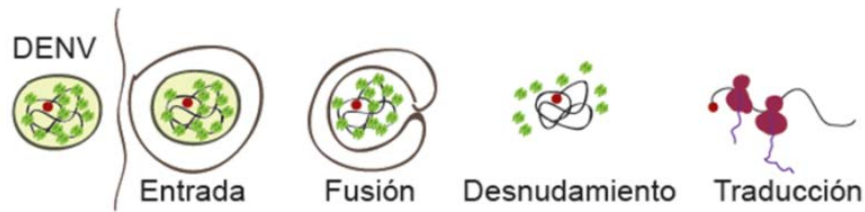


Figura 51. Representación esquemática de los eventos durante la entrada y desnudamiento viral.

Detección de la proteína de cápside que entra a la célula en la partícula viral

Para estudiar el proceso de desnudamiento de DENV fue necesario desarrollar y poner a punto herramientas que permitieran evaluar eventos tempranos de la infección. Con el objetivo de comenzar con la caracterización del proceso de desnudamiento del genoma de DENV, se decidió examinar qué sucedía con la proteína de cápside durante la infección. Realizando ensayos de western blot de extractos celulares en los que se permitió la adsorción del virus, pero no su ingreso a la célula, se pudo detectar a la proteína de cápside que forma parte del virión. El tratamiento con proteinasa K (PK) de las células expuestas al virus causó la remoción de las partículas virales adsorbidas en la superficie celular (Figura 52.).

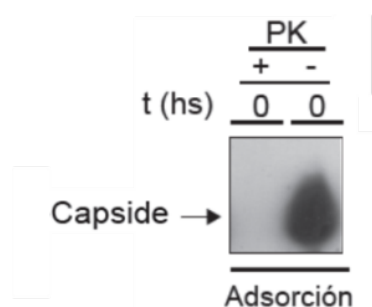


Figura 52. Western blot utilizando anticuerpos contra cápside. El panel derecho muestra a la proteína de la cápside en el interior de viriones adsorbidos a la célula. En el panel izquierdo se observa la eliminación completa de los viriones adsorbidos debido al tratamiento con PK.

A continuación, se realizaron ensayos similares, pero permitiendo la internalización del virus a la célula. Luego de incubar las células durante 1 hora a 4°C para permitir la adsorción del virus, se cambió el medio extracelular y las mismas fueron transferidas a 37°C permitiendo así la internalización de DENV. Extractos celulares para western blot fueron tomados a distintos tiempos post infección, tratándolos siempre con PK para

eliminar al virus adsorbido no internalizado (Figura 53.A). Los resultados de este experimento sugieren que es posible detectar a la proteína de cápside que ingresa a la célula formando parte del virión, aun a tiempos muy cortos luego de la infección, ya que a 1 hpi se detecta señal de cápside en el interior de la célula (Figura 53.B).

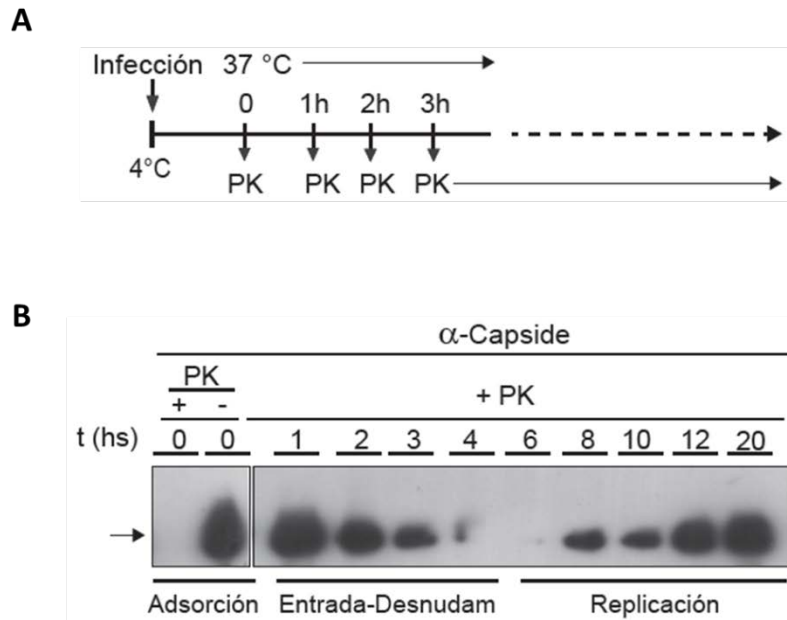


Figura 53. **A.** Esquema del protocolo experimental. **B.** Western blot de extractos celulares revelado contra la proteína de cápside a distintos tiempos post infección; todas las muestras fueron tratadas con PK.

El experimento presentado en la Figura 53 permitió ver no sólo a la proteína que ingresa a la célula durante la infección, sino también analizar los cambios en los niveles de cápside a lo largo del ciclo viral. El estudio de niveles de cápside en función del tiempo de infección mostró que la proteína es degradada a tiempos cortos, presentando una vida media estimada de 90 minutos, y que a las 4 horas post infección cápside es apenas detectable. A partir de las 8 horas se ve que la proteína comienza a ser sintetizada nuevamente, como resultado de la amplificación del genoma del virus (Figura 54).

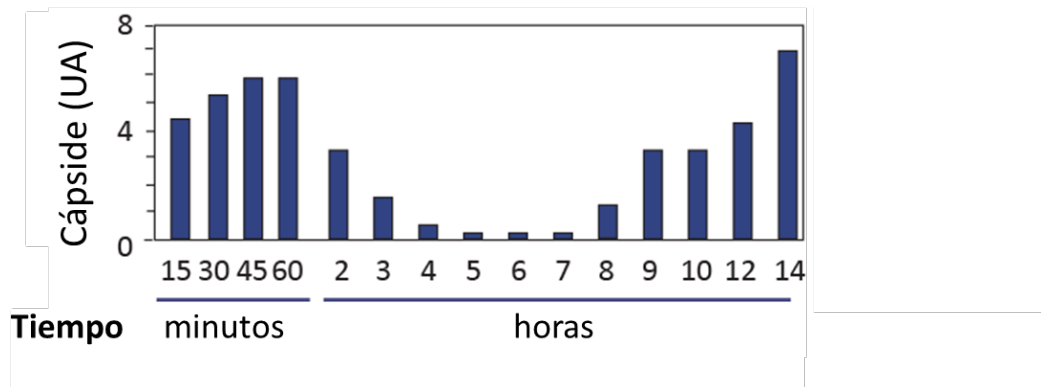


Figura 54. Niveles de proteína de cápside dentro de la célula en función del tiempo post infección.

Debido a que es posible que las primeras rondas de traducción contribuyan al primer pico detectado de proteína de cápside, se decidió repetir el estudio de niveles de cápside en función del tiempo post infección, pero en presencia de cicloheximida (CHX). Mediante el uso de este compuesto, la traducción celular es inhibida permitiendo exclusivamente la detección de la proteína de la cápside entrante. Este ensayo demostró que los niveles de proteína de cápside detectados entre los 15 minutos y 4 horas después de la infección no fueron significativamente diferentes en presencia o ausencia del inhibidor de la traducción (Figura 55).

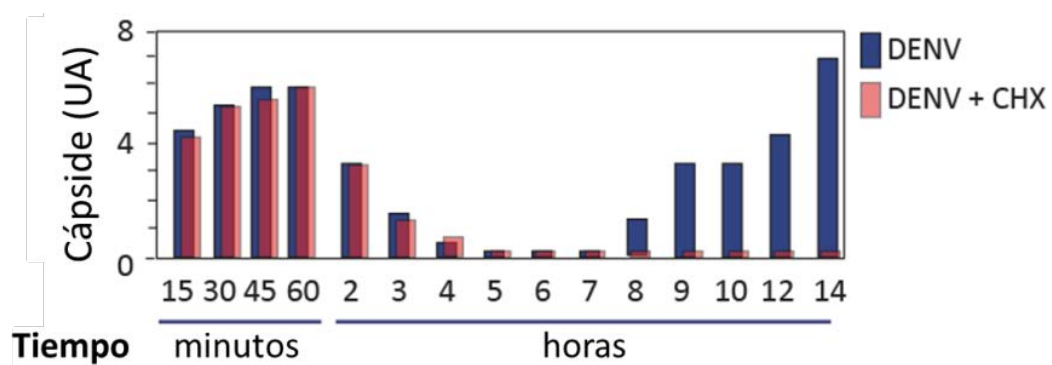


Figura 55. Niveles de proteína de cápside dentro de la célula en función del tiempo post infección en presencia (barras rojas) y ausencia (barras azules) de cicloheximida (CHX).

Tal como era esperado, el aumento de los niveles de cápside que se ve en el control no es detectado en presencia de CHX, debido a que no hay replicación del ARN viral al inhibir la traducción. Estos resultados indican que las primeras rondas de traducción

del genoma viral entrante no contribuyen de manera significativa a la proteína detectada durante las primeras horas post infección.

Los resultados hasta aquí presentados indican que los niveles de proteína de cápside siguen una curva bifásica durante la infección, en donde el primer pico corresponde a la detección de la proteína que forma parte de la partícula viral internalizada, y el segundo pico está asociado a la proteína sintetizada a partir del ARN genómico amplificado.

Estudio de la degradación de la proteína de cápside que entra a la célula en la partícula viral

Con el objetivo de examinar si la degradación de cápside es dependiente del proteasoma, se utilizó un protocolo similar al descrito anteriormente, pero en esta oportunidad el ensayo se realizó en presencia del inhibidor de proteasoma, MG132. Además, las células infectadas fueron tratadas con CHX para evitar la síntesis de nuevas proteínas. El análisis de los niveles de cápside en función del tiempo en estas condiciones mostró un aumento significativo en la estabilidad de cápside, incrementando la vida media de la proteína de 90 minutos en el control, a 5 horas en presencia de MG132 (Figura 56). Estos resultados sugieren que la degradación de cápside es un proceso dependiente de la actividad del proteasoma.

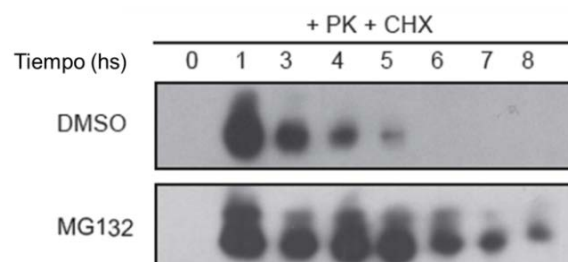


Figura 56. Western blot de extractos celulares revelado contra la proteína de cápside en función del tiempo post infección. Se muestra el decaimiento de la proteína de cápside que entra a la célula dentro de la partícula viral, en presencia de CHX y DMSO (panel superior) o CHX y MG132 (panel inferior).

A partir de esta observación surgió la hipótesis de que el desnudamiento del genoma de dengue podría requerir la degradación de cápside, lo cual ocurriría mediante la actividad del proteasoma, de manera similar a lo descrito para *poxvirus* (Mercer et al., 2012).

Una herramienta importante para evaluar la liberación del genoma viral al citoplasma durante el desnudamiento es la medición de las primeras rondas de la traducción, las cuales fueron indetectables a través de ensayos de western blot contra cápside y otras proteínas virales. Por lo tanto, se decidió evaluar si el virus reportero DV-R, previamente introducido en el Capítulo 1, era una herramienta útil para detectar la traducción temprana del ARN que entra a la célula dentro de la partícula viral (Figura 20).

La Figura 57 muestra que la infección de células con un stock de DV-R permite la detección de las primeras rondas de traducción viral, dado que ya a las 2 horas post infección se detecta actividad luciferasa, lo cual no ocurre al tratar las células con un inhibidor de la traducción (puromicina).

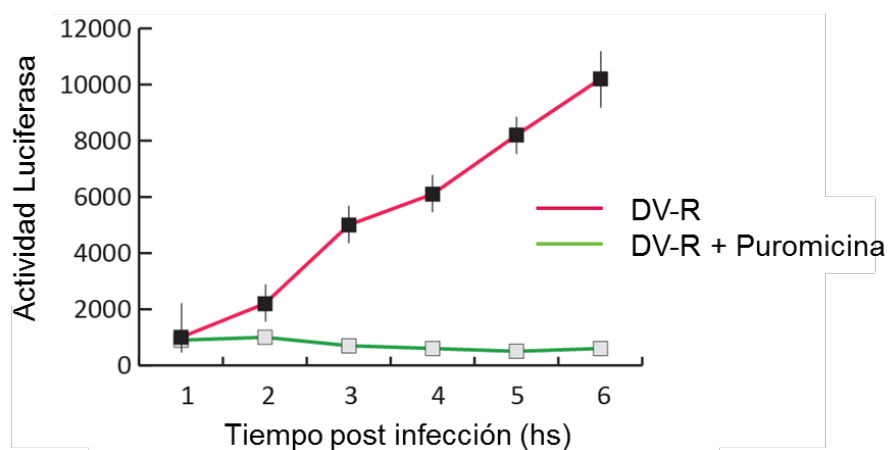


Figura 57. Medición de las primeras rondas de la traducción viral seguida a través de actividad luciferasa, en presencia (línea verde) o ausencia (línea roja) del inhibidor de traducción.

Si la degradación de cápside fuera necesaria para que ocurra el desnudamiento del genoma, las primeras rondas de traducción deberían resultar impedidas al inhibir la actividad del proteasoma. Por lo tanto, utilizando el sistema DV-R, se evaluó el impacto

de MG132 sobre las primeras rondas de traducción viral. Inesperadamente, la traducción del genoma viral no se vio afectada en presencia del inhibidor (Figura 58).

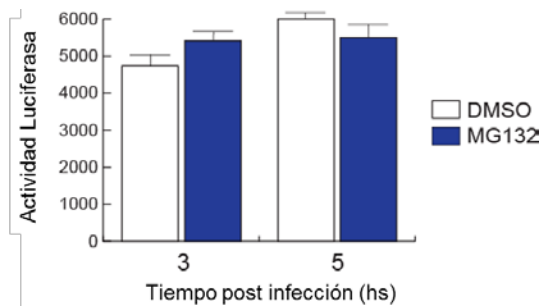


Figura 58. Actividad luciferasa en células infectadas con DV-R en presencia (barras azules) o ausencia (barras blancas) de MG132; medición a 3 y 5 horas post infección.

Estos resultados apoyan la idea de que la proteína de cápside es degradada por un proceso dependiente del proteasoma, pero este paso no es requerido para la liberación del genoma viral para su traducción. Por ende, se concluye que la degradación de cápside no es la causa de la liberación del genoma de DENV, y probablemente el decaimiento de la proteína ocurre cuando el ARN del virus ya se ha liberado.

Análisis del requerimiento de la maquinaria de ubiquitinación celular durante el desnudamiento viral

Teniendo en cuenta que la vía del proteasoma habitualmente es dependiente de ubiquitina, se decidió evaluar si la ubiquitinación es necesaria para la degradación de la proteína de cápside que ingresa a la célula dentro de la partícula de DENV.

La ubiquitinación es una PTM orquestada por la acción secuencial de la enzima activadora de ubiquitina (E1), la enzima conjugadora de ubiquitina (E2), y la ubiquitin-ligasa (E3). Inicialmente, la ubiquitina es activada por la enzima E1 en un proceso que requiere ATP como fuente de energía; a continuación, la ubiquitina activada es transferida a la enzima conjugadora, E2. Las E3 de la familia HECT sufren la transferencia de la ubiquitina activada antes de que sea transferida a la proteína blanco, mientras que otros tipos de E3 ligasas, como las RING, no parecen poseer

actividad enzimática, y funcionarían como plataforma para que ocurra la reacción de conjugación (Figura 59) (Woelk et al., 2007).

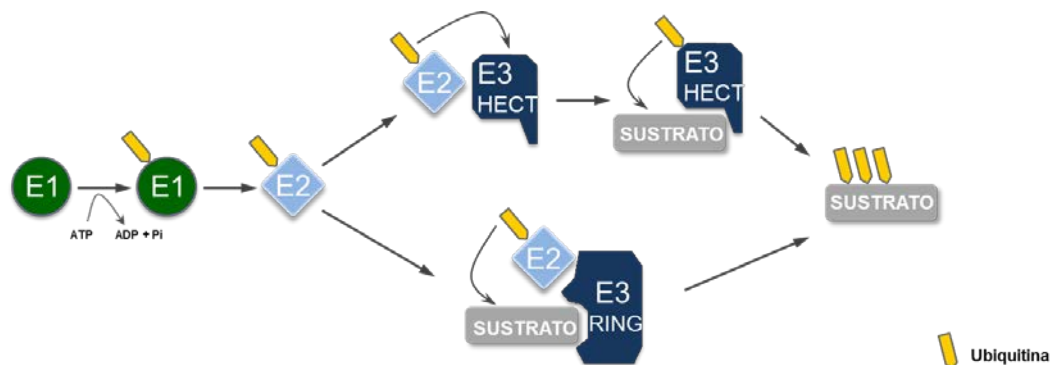


Figura 59. Esquema simplificado del proceso de ubiquitinación de proteínas (Adaptado de Woelk et al., 2007)

Con el fin de examinar si la inhibición de la maquinaria de ubiquitinación afecta la estabilidad de cápside durante la infección, células infectadas con DENV fueron incubadas con CHX para evitar la detección de proteína sintetizada *de novo*, y se trataron o no con el inhibidor de la maquinaria de ubiquitinación, UBEI 41. Está reportado que UBEI 41 actúa bloqueando la actividad de la enzima activadora de ubiquitina, E1. Extractos celulares para western blot fueron colectados a distintos tiempos post infección, siempre tratando a las células con PK para eliminar a la proteína proveniente de virus adsorbidos, no internalizados. Los resultados del ensayo sugieren un leve retraso en la entrada del virus, dado que se detecta alrededor de un 20% menos de proteína de cápside internalizada con respecto al control (Figura 60). Sin embargo, al igual de lo que se observó con MG132, la estabilidad de cápside se vio muy aumentada al tratar las células infectadas con el inhibidor de la maquinaria de ubiquitinación, aumentando la vida media de la proteína de 90 minutos en el control, a aproximadamente 6 horas en presencia de UBEI 41 (Figura 60).

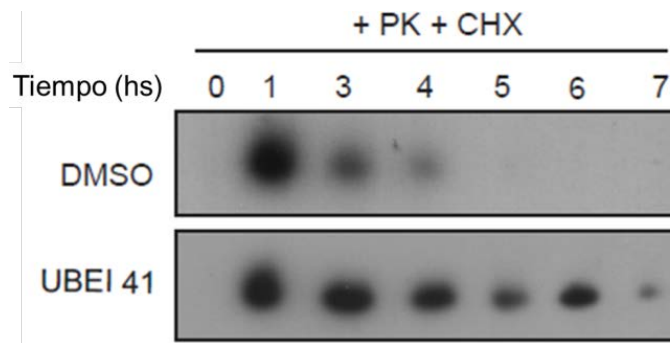


Figura 60. Western blot de extractos celulares revelado contra la proteína de cápside en función del tiempo post infección. Se muestra el decaimiento de la proteína de cápside que entra a la célula dentro de la partícula viral, en presencia de CHX y DMSO (panel superior) o CHX y UBEI 41 (panel inferior).

Estos resultados demuestran que la vía ubiquitina-proteasoma es responsable de la degradación de cápside luego de la entrada del virus a la célula.

Los estudios realizados con MG132 indicaron que la degradación de cápside no es necesaria para el desnudamiento del genoma viral (Figura 58). Sin embargo, sorprendentemente, el inhibidor de la enzima activadora de ubiquitina impidió las primeras rondas de traducción (Figura 61).

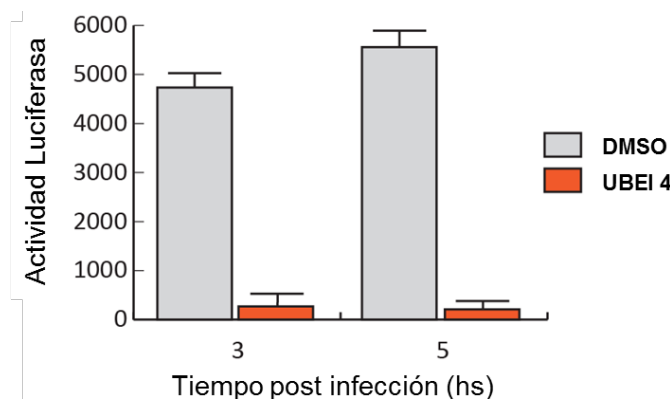


Figura 61. Actividad luciferasa en células infectadas con DV-R en presencia (barras naranjas) o ausencia (barras grises) de UBEI 41; medición a las 3 y 5 horas post infección.

Dado que es posible que UBEI 41 tenga un efecto directo e inespecífico sobre la maquinaria de traducción, se realizaron controles que consistieron en ensayos de traducción en presencia o ausencia de UBEI 41 luego de transfectar el ARN viral, sorteando así las etapas de entrada y desnudamiento viral. Los resultados de este experimento indican que el efecto de UBEI 41 es específico sobre el desnudamiento,

ya que cuando el ARN viral es transfectado, el efecto sobre traducción de UBEI 41 no se manifiesta (Figura 62).

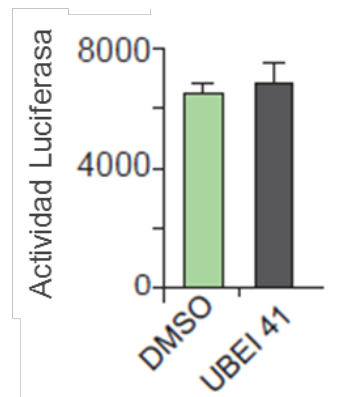


Figura 62. Medición de actividad luciferasa de células transfectadas con DV-R, en presencia (barra gris) o ausencia (barra verde) de UBEI 41.

Con el objetivo de confirmar el efecto específico de UBEI 41 sobre la entrada de DENV, y para tener un control adicional, se diseñó un experimento en el cual la infección se llevó a cabo en ausencia de UBEI 41, y se permitió la internalización y el desnudamiento del virus durante 2 horas, tiempo después del cual se añadió el inhibidor (Figura 63.A). Si el efecto inhibitorio de UBEI 41 fuese general sobre la maquinaria de traducción de la célula, no debería detectarse actividad luciferasa a las 6 hpi. En estas condiciones, los niveles de traducción fueron indistinguibles entre las células tratadas con UBEI 41 o DMSO (Figura 63.B), nuevamente apoyando la idea de que el inhibidor no tiene un efecto inespecífico sobre la maquinaria de traducción del hospedador sino que afecta un evento temprano durante la infección de DENV.

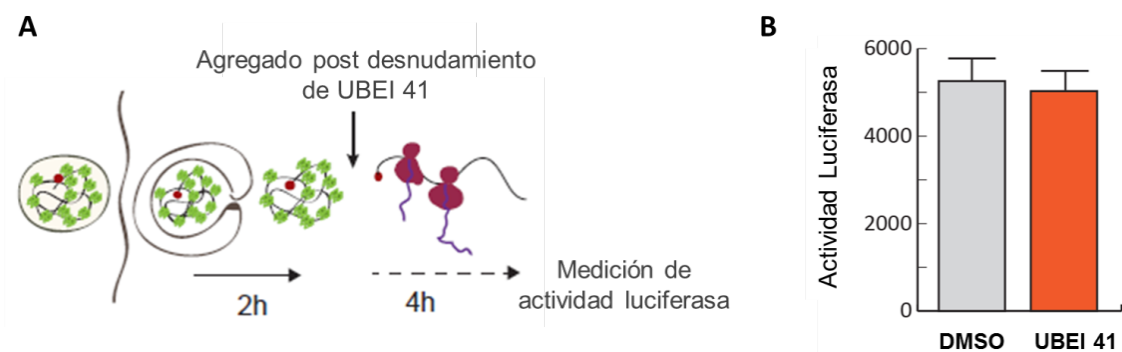


Figura 63. **A.** Esquema del protocolo experimental. **B.** Actividad luciferasa en células infectadas con DV-R en presencia (barras naranjas) o ausencia (barras grises) de UBEI 41, el cual se adicionó a las 2 horas post infección.

En conjunto, los resultados confirman que la actividad de la enzima activadora de ubiquitina E1 es necesaria durante un evento temprano en la infección por DENV, posterior a la internalización y anterior a la traducción viral. Llamativamente, el requisito de ubiquitinación para este proceso es independiente de la actividad del proteasoma.

Para definir con mayor precisión la ventana de sensibilidad a UBEI 41, se realizó una curva de tiempo de adición del inhibidor, en la cual se pre-incubó o se adicionó UBEI 41 a distintos tiempos después de la infección (5, 10, 30 ó 120 minutos) (Figura 64.A).

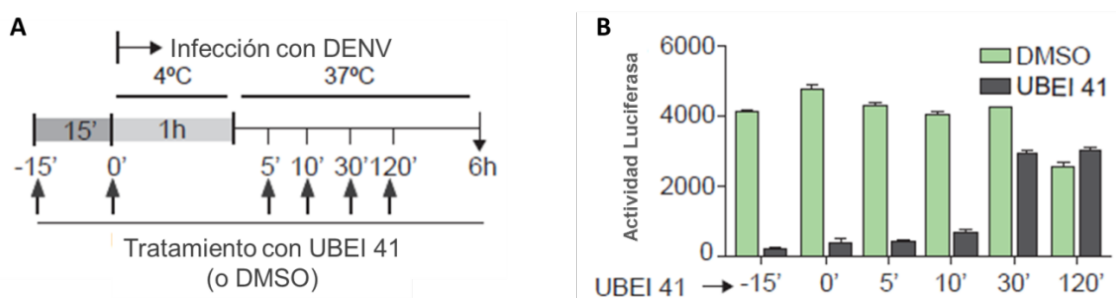


Figura 64. **A.** Esquema del protocolo experimental. **B.** Medición de actividad luciferasa a las 6 hpi. Los compuestos UBEI 41 (barras grises) o DMSO (barras verdes) fueron agregados al tiempo indicado en cada caso y se mantuvieron hasta realizar la medición.

Los resultados de dicho ensayo, presentados en la Figura 64.B, evidencian que el inhibidor de la maquinaria de ubiquitinación bloquea las primeras rondas de traducción sólo si es agregado hasta 30 minutos posteriores a la infección, sugiriendo que UBEI 41 ejerce su efecto sobre un evento muy temprano durante la infección con DENV.

Para corroborar el requerimiento de la actividad de la enzima activadora de ubiquitina E1, para una infección productiva empleando una metodología alternativa, se decidió realizar un silenciamiento del blanco de UBEI 41 (UBA1) utilizando siARNs. Para ello, se transfectaron células con siARNs dirigidos contra UBA1, y se realizaron también controles positivos (siARN para luciferasa de Renilla) y negativos (siARN no relacionado). Luego de confirmar una reducción cercana al 85% en los niveles de mRNA de UBA1 a las 48 hpt (Figura 65.A), las células fueron infectadas con el DV-R y se midió actividad luciferasa a tiempos cortos para evaluar las primeras rondas de la

traducción. El silenciamiento de UBA1 disminuyó 4 veces los niveles de traducción viral, dando valores similares a los observados para el control positivo (luciferasa de Renilla) (Figura 65.B). Estos resultados confirman el requerimiento de la enzima activadora de ubiquitina, E1, en una etapa temprana durante la infección con DENV.

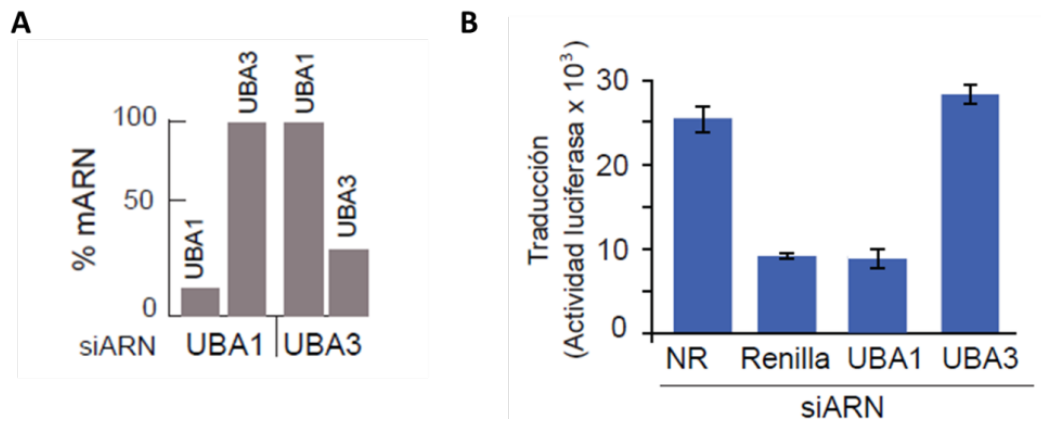


Figura 65. **A.** Cuantificación por PCR en tiempo real de los niveles de mARN de UBA1 y UBA3 en células silenciadas para uno u otro mensajero. **B.** Medición de actividad luciferasa 6 hpi de células transfectadas con siARNs dirigidos contra UBA1, UBA3, luciferasa de Renilla (control positivo) y un siARN no relacionado (NR, control negativo).

Análisis del requerimiento de proteínas de la familia Cullin-RING E3 ligasas durante el desnudamiento viral

El requerimiento de ubiquitinación de proteínas que participan en la maduración y el tráfico de endosomas ha sido descrito previamente (Greene et al., 2012, Piper et al., 2014, Su et al., 2013). Para diferentes virus, incluyendo Influenza y Vaccinia, se ha demostrado que miembros de la familia de las Cullin-RING E3 ligasas (CRL), como Cullin3, están involucrados en desnudamiento viral (Huotari et al., 2012, Mercer et al., 2012). Para evaluar si este es un requisito compartido por DENV, se decidió silenciar una proteína que participa en la PTM (a través de nedilación) de los miembros de la familia CRL, esencial para la actividad de estas E3 ligasas (Enchev et al., 2015). En este sentido, se utilizaron siARNs dirigidos contra UBA3, uno de los 2 componentes que conforman dicha enzima, para evaluar el impacto en la entrada y traducción de DENV. Los resultados, presentados en la Figura 65.B indican que, a diferencia de lo observado con UBA1, el silenciamiento de UBA3 no afecta las primeras rondas de traducción viral. Para confirmar esta observación por un método alternativo, se empleó un inhibidor farmacológico de nedilación, MLN 4924, el cual bloquea la actividad de las CRL E3 ligasas. En este experimento, las células se trataron con MLN 4924, UBEI 41 o DMSO y se infectaron con DV-R (Figura 66).

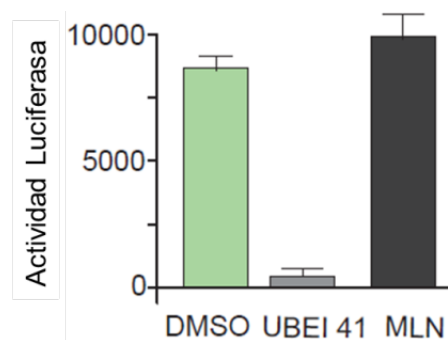


Figura 66. Actividad de luciferasa de células infectadas con DV-R en presencia de UBEI 41, DMSO o MLN4924 (inhibidor de neddylation); medición realizada a las 6 horas post infección.

Los resultados, presentados en la Figura 66, indican que la traducción viral no fue afectada por el tratamiento MLN 4924, lo cual sugiere que DENV no requiere la actividad de ninguna CRL durante el desnudamiento de su genoma.

Análisis de cápside como posible blanco de ubiquitinación

Los resultados presentados hasta esta sección demostraron que la proteína de cápside es degradada por el proteasoma, pero esta degradación no es requerida para la liberación del genoma viral al citoplasma celular. Además, la actividad de la enzima activadora de ubiquitina E1, resultó ser fundamental para que haya traducción del ARN de DENV, pero no para que el virus sea internalizado a la célula hospedadora. Existe la posibilidad de que la proteína de cápside sea ubiquitinada, y dicha modificación funcione como una señal para el desensamblado de la nucleocápside, tal como ya fue descrito anteriormente para el desensamblado de complejos ribonucleoproteicos celulares por medio de la proteína p97 (Zhou et al., 2013).

Con el objetivo de analizar si la proteína de cápside sufre ubiquitinación no degradativa para la liberación de ARN viral durante la infección, se generaron virus recombinantes en donde las 11 lisinas presentes en cápside (posibles blancos de ubiquitinación) fueron parcial o totalmente sustituidas por argininas. Se generaron así 6 virus recombinantes con sustituciones KxR parciales, y un virus con todas las K de cápside remplazadas por R (cápside K-less) (Figura 67.A).

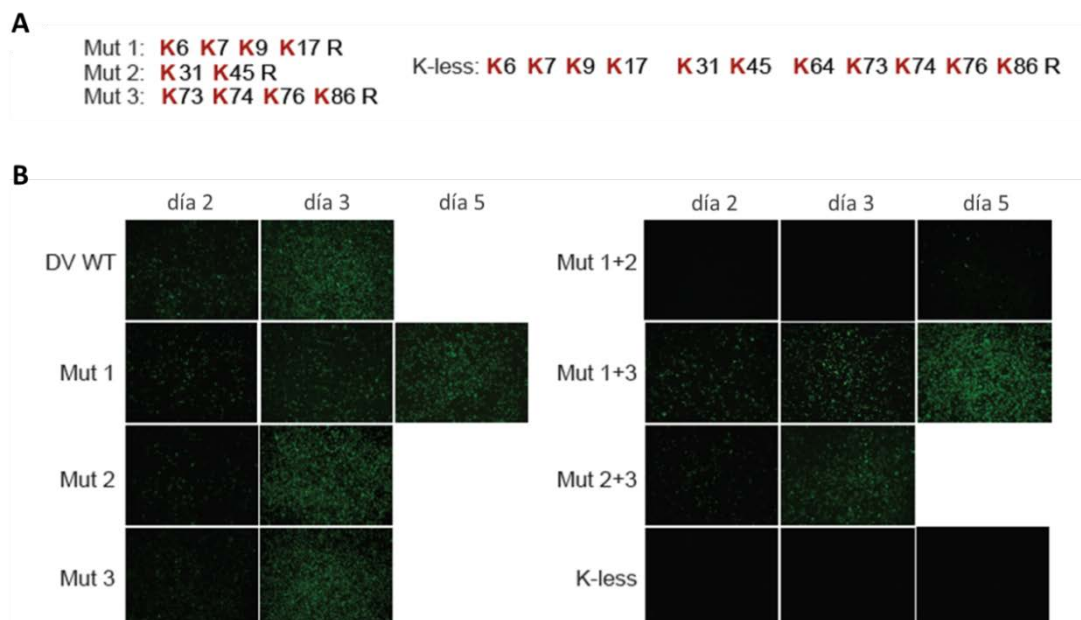


Figura 67. **A.** Posición de las lisinas de cápside que fueron sustituidas por arginina en cada mutante (Mut 1, Mut 2 y Mut 3). Se construyeron también mutantes combinadas de los 3 grupos (Mut 1+2, Mut 1+3, Mut 2+3 y K-less). **B.** Inmunofluorescencias indirectas contra la proteína E de DENV que evidencian la propagación de los virus WT y mutantes en células de mamífero.

Las células fueron transfectadas con los ARNs correspondientes a dichas mutantes, junto con un ARN WT, y la propagación del virus se estudió a través de IFI en función del tiempo (Figura 67.B). Las mutantes denominadas Mut 2 y Mut 3 presentaron una velocidad de propagación similar al virus WT, mientras que la Mut 2+3 exhibió un leve retraso. En contraste, todas las construcciones que incluyeron los cambios contenidos en Mut 1 (Mut 1, Mut 1+2, Mut 1+3 y K-less) mostraron un importante retraso o impedimento en la propagación viral. A fin de evaluar la replicación de estas construcciones, se analizó la expresión de la proteína de cápside para cada mutante a través de western blot (Figura 68).

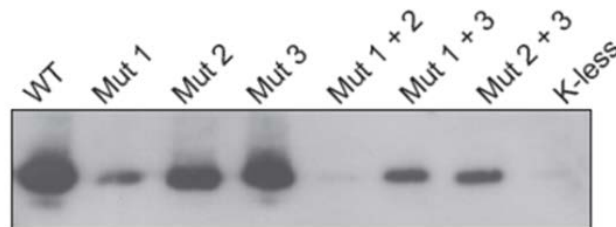


Figura 68. Western blot contra la proteína C para estudiar su expresión y procesamiento. Los ARNs del virus WT y de las mutantes se transfectaron en células de mamífero y se cosecharon extractos celulares a las 24 horas post transfección.

La información obtenida en la Figura 68 se correlaciona con lo observado en el ensayo de IFI, ya que las mutantes que no mostraban propagación (Figura 67.B), también exhibieron bajos niveles de proteína de cápside (Figura 68). Existen varias posibilidades para explicar estos resultados; es posible que lisinas en posiciones específicas sean necesarias para el ensamblado y/o infección del virus, incluyendo la posible ubiquitinación de cápside; sin embargo, debido a que la secuencia codificante de cápside contiene elementos de ARN que regulan la circularización del genoma viral (Figura 8), las mutaciones introducidas podrían tener un impacto sobre la formación de estructuras de ARN fundamentales, afectando la replicación del genoma de DENV.

Con el fin de estudiar esta última posibilidad, las mutaciones se introdujeron en un nuevo virus reportero denominado DV-RD (Figura 69.A). A diferencia del virus reportero utilizado en los Capítulos 1 y 2, este virus permite estudiar el impacto de las mutaciones en cápside sobre la replicación del genoma viral. Para evaluar dicho impacto, se transfectaron células con el ARN correspondiente a la construcción DV-RD K-less, junto con los controles del virus WT y el virus con la polimerasa viral mutada (Mut NS5) (Figura 69.B).

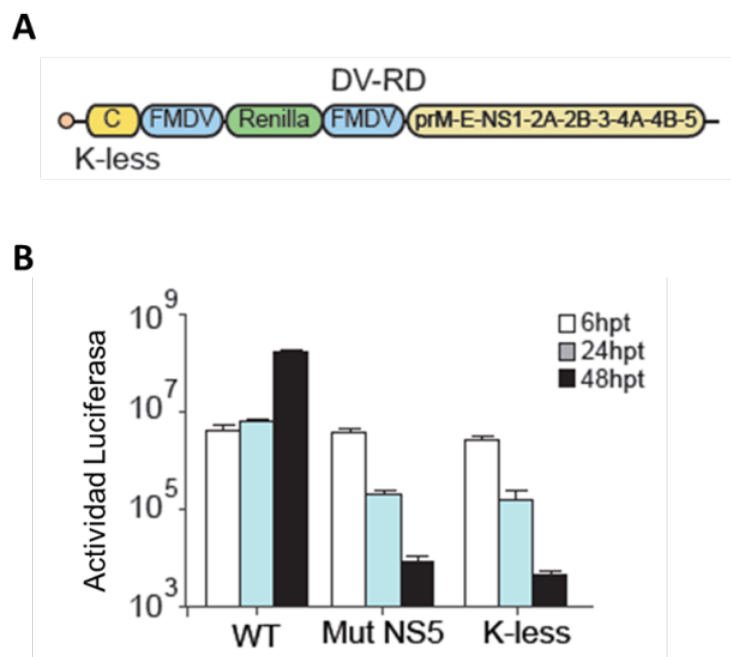


Figura 69. **A.** Representación esquemática del virus reportero DV-RD, se indica la posición en la que se incorporaron las sustituciones KxR en cápside. **B.** Traducción y replicación de los distintos reporteros en las células transfectadas, seguidos por medición de actividad de luciferasa en función del tiempo. Se muestran DV-RD WT, K-less y un control con la polimerasa viral inactiva (Mut NS5).

Los niveles de traducción de las tres construcciones fueron similares; sin embargo, la síntesis de ARN de DV-RD K-less se vio seriamente afectada, tal como se aprecia a las 24 y 48 horas post transfección. Estos resultados indican que los cambios nucleotídicos introducidos para modificar residuos en la proteína de cápside afectan drásticamente la replicación del genoma viral, probablemente porque desbalancean el delicado equilibrio necesario entre las estructuras lineal y circular del ARN (Figura 8).

Para evaluar el impacto de las mutaciones exclusivamente en las funciones de la proteína de cápside, se utilizó el sistema ya introducido, DV-R. Como se detalló previamente, este reportero contiene una duplicación de los elementos de ARN que actúan en *cis*, por lo que las mutaciones en cápside pueden ser evaluadas sólo a nivel de proteína (Figura 70.A). Los ARNs del DV-R WT y de las 6 mutantes de lisina fueron transfectadas en células de mamífero, y tal como se esperaba, en esta oportunidad no perjudicaron la traducción ni la replicación del genoma viral (Figura 70.B); confirmando el exitoso desacoplado de la síntesis de ARN y las funciones de la proteína de cápside.

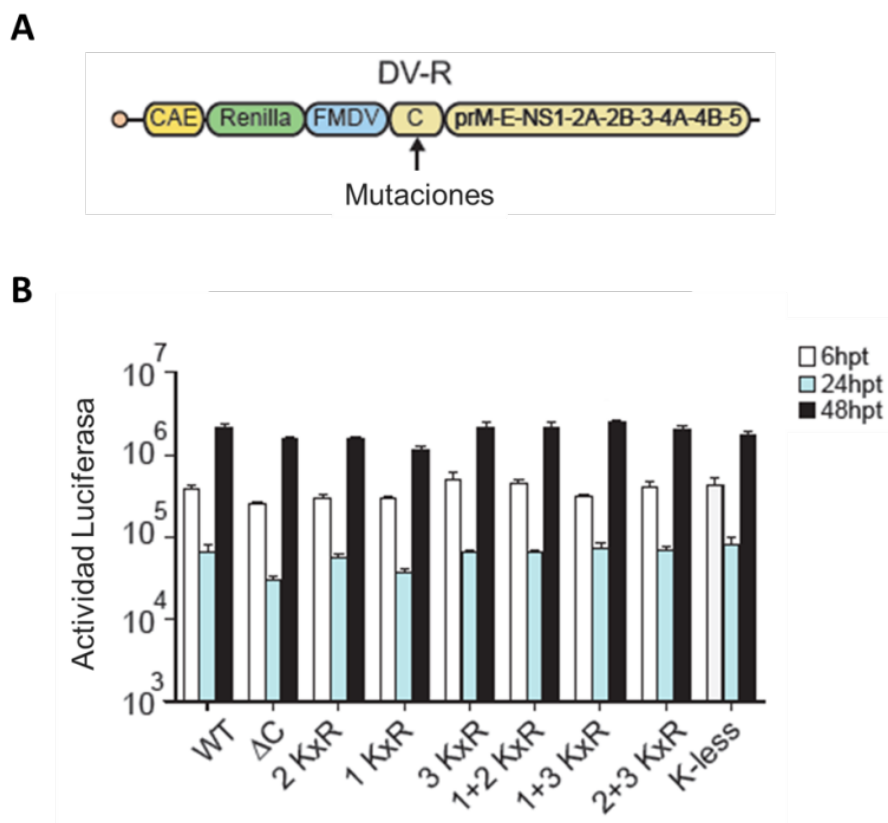


Figura 70. **A.** Esquema del virus reportero, DV-R, se señala la posición en la que se introdujeron las mutantes (Mut 1, Mut 2, Mut 3, Mut 1+2, Mut 1+3, Mut 2+3 y K-less). **B.** Transfección de células de mamífero con los ARNs de DV-R WT o mutantes.

Con el objetivo de analizar el efecto de las mutaciones en la producción de partículas virales infectivas, los sobrenadantes de las células transfectadas fueron empleados para infectar células frescas (Figura 71). Si la ubiquitinación de lisinas fuese un requisito para que ocurra el desnudamiento viral, el virus K-less no debería ser infectivo.

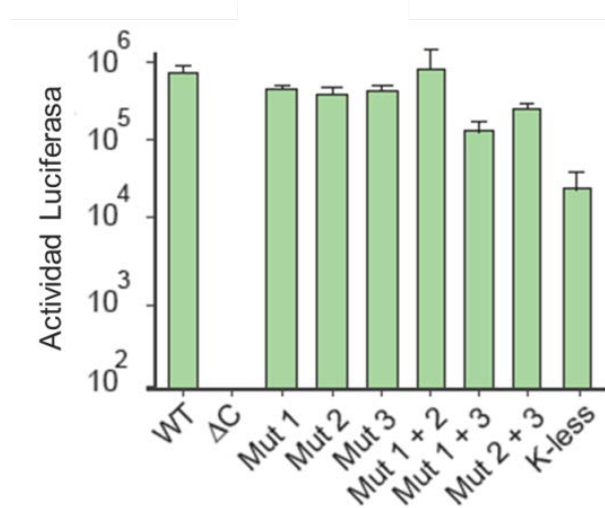


Figura 71. Infección con los sobrenadantes de transfección provenientes de la Figura 70.B.

A pesar de que las construcciones Mut 1+3 y K-less exhibieron una reducción en la infectividad (medida a través de actividad luciferasa), ambas mantuvieron la habilidad de producir partículas virales, las cuales fueron capaces de infectar células frescas. Las otras mutantes mostraron niveles de infección similares al DV-R WT (Figura 71). En conjunto, estos resultados sugieren que la ubiquitinación de las lisinas de cápside no es un requerimiento esencial para el desnudamiento del DENV.

Importancia de la ubiquitinación para la liberación del genoma viral durante la infección

Para continuar con la caracterización del requerimiento de la maquinaria de ubiquitinación durante el desnudamiento viral, se analizó por PCR en tiempo real si era posible detectar al genoma viral que ingresa a la célula durante la infección con DENV. Una vez confirmada la factibilidad de la detección, se caracterizaron los niveles de ARN en función del tiempo post infección, y el impacto generado por la inhibición UBA1. El genoma viral se cuantificó a lo largo de un ciclo de replicación del virus, y se encontró que los niveles de ARN en función del tiempo post infección siguen un patrón similar al observado para la proteína de cápside (comparar Figura 55 y Figura 72.A). Los niveles más elevados de cantidad de genoma entrante fueron entre 1 y 2 horas después de la infección, y luego disminuyeron.

Teniendo en cuenta la cinética de traducción, el genoma que entra se desnuda, es traducido, y mayormente degradado a las pocas horas después de la internalización. Los experimentos de la Figura 72.A muestran que menos de 5% del genoma que ingresa es responsable de la amplificación del ARN viral, la cual presenta una cinética exponencial (Figura 72.A).

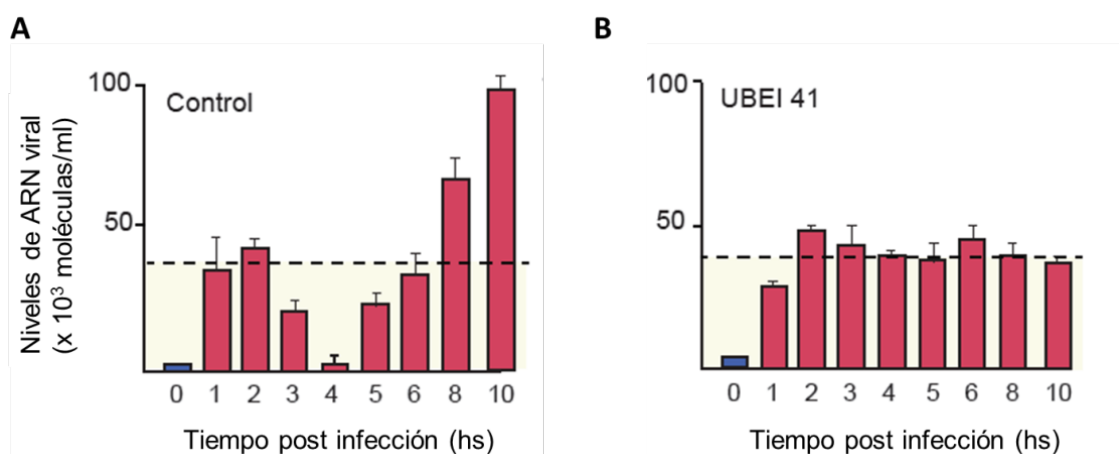


Figura 72. A. Niveles de ARN viral en función del tiempo post infección medidos por PCR en tiempo real de células tratadas con DMSO. B. Niveles de ARN viral en función del tiempo post infección medidos por PCR en tiempo real de células tratadas con UBEI 41. Las partículas virales adsorbidas no internalizadas fueron eliminadas por tratamiento con PK en todos los tiempos cosechados.

Con el objetivo de evaluar el impacto de la inhibición de la maquinaria de ubiquitinación en el destino del genoma durante la entrada del virus, se infectaron células tratadas con UBEI 41 y se midió la cantidad de ARN en función del tiempo mediante PCR en tiempo real. En estas condiciones el ARN viral resultó internalizado, pero los niveles de genoma se mantuvieron constantes incluso a 10 horas después de la infección (Figura 72.B). Este resultado indica que el desnudamiento/degradación del genoma viral se evita por la inhibición de la ubiquitinación. Estos datos confirman la necesidad de ubiquitinación para la liberación del genoma, ya sea de endosomas o de la nucleocápside, y explican por qué las primeras rondas de traducción del virus resultaron impedidas en ausencia de ubiquitinación.

DISCUSIÓN CAPÍTULO 3

El mecanismo por el cual el genoma viral es liberado de la nucleocápside durante la infección es uno de los procesos menos caracterizados del ciclo de vida de los flavivirus. En este capítulo, se muestran resultados en los que se vio que la ubiquitinación, pero no la actividad del proteasoma, es crucial para la liberación al citoplasma del ARN de DENV proveniente de partículas virales. Además, se determinó que la degradación de cápside depende de la actividad del proteasoma, pero su decaimiento no es requerido para el desnudamiento del genoma viral. Las observaciones presentadas en este capítulo apoyan un modelo en el cual la degradación de cápside ocurre de manera independiente de la asociación del ARN viral con la maquinaria de traducción de la célula hospedadora. Más aun, la inhibición de la enzima E1 (enzima activadora de ubiquitina) bloquea el desnudamiento del genoma, provocando que el ARN viral quede protegido/inactivo, ya sea por quedar retenido dentro de endosomas o nucleocápsides. Estos son los primeros experimentos en los que se estudia directamente el proceso de desnudamiento del genoma de DENV y proporcionan una ventana de oportunidad para la inhibición viral.

Durante los últimos años se han identificado modos no convencionales de utilización del proteasoma y la maquinaria de ubiquitinación para el desnudamiento viral, tanto en virus de ADN como de ARN. Para el virus Vaccinia, se demostró que la liberación de su genoma de la proteína Core requiere la actividad del proteasoma; sin embargo no se necesita de la maquinaria de ubiquitinación. Además, se vio que la proteína Core ya estaba ubiquitinada dentro de la partícula viral (Mercer et al., 2012). Para el virus Influenza A (IAV), se demostró recientemente que la ubiquitinación es esencial para el desnudamiento viral; en el virion, la proteína de cápside fue hallada con cadenas de ubiquitina no covalentemente unidas (Banerjee et al., 2014). Más aun, se identificó a la E3-ubiquitin ligasa Itch como un factor fundamental durante eventos tempranos del ciclo de vida de IAV. En células sin Itch, la incorporación a endosomas de la ribonucleoproteína viral no se vio afectada, pero su liberación de los mismos resultó retrasada (Su et al., 2013). En este capítulo se describió para DENV una forma alternativa de empleo del proteasoma y la maquinaria de ubiquitinación, en donde un

paso de ubiquitinación no degradativa es requerido para que ocurra la liberación del genoma viral al citoplasma. Tanto la inhibición farmacológica de la ubiquitin-E1, como el silenciamiento de UBA1 fueron suficientes para bloquear la infección de DENV. En este sentido, estudios previos reportaron un aumento en la expresión de UBA1 durante la infección con dengue en células primarias humanas, apoyando la idea que el virus utiliza y regula este factor celular (Kanlaya et al., 2010). Más aun, en el mismo estudio se reportó una disminución en el título viral al inhibir UBA1. Los resultados presentados en esta sección son consistentes con este estudio previo, y proporcionan una explicación al retraso observado en la propagación viral.

El requerimiento de ubiquitinación durante la infección de flavivirus había sido previamente reportado mediante estudios realizados con ARNs de interferencia (Krishnan et al., 2008). En ese trabajo se propuso la participación de la ubiquitin-ligasa CBL1 en la internalización de WNV; además, se sugirió que la inhibición de la actividad del proteasoma bloqueaba la infección de WNV. Sin embargo, otro grupo observó que el silenciamiento de CBL1 no afectaba la internalización de partículas de WNV o DENV, y que la inhibición del proteasoma mediante MG132 o lactacistina no modificaba la entrada de WNV, sugiriendo que dicha maquinaria no era requerida en etapas tempranas de la infección (Fernandez-Garcia et al., 2011). Los resultados aquí presentados apoyan la idea de que MG132 no afecta la internalización, desnudamiento ni traducción del genoma viral (Figura 58). Además, al no ver efecto en traducción al silenciar o inhibir la actividad de la familia CRL, se excluyó la participación de un gran número de E3-ligasas en la liberación del genoma de DENV (Figura 66).

Inicialmente se especuló que la proteína de cápside que ingresa a la célula dentro del virion podría ser ubiquitinada como señal para el desnudamiento. En este sentido, se ha reportado que la proteína celular p97 (VCP) posee la capacidad de desarmar complejos ribonucleoproteicos mediante la detección de proteínas ubiquitinadas (Zhou et al., 2013). Considerando dicha información, se intentó detectar ubiquitinación en la proteína C que entra a la célula dentro de la partícula viral; a pesar de haber usado numerosas técnicas para detectar a cápside ubiquitinada, los ensayos se vieron dificultados debido a la poca cantidad de proteína disponible y a la estrecha ventana

temporal adecuada para el ensayo. Como ensayo alternativo, se decidió construir virus reporteros recombinantes, en donde las lisinas de la proteína de cápside fueron sustituidas por argininas, manteniendo así la carga pero no la posibilidad de ubiquitinación. Los resultados de estos ensayos indicaron que un virus con una cápside sin lisinas es capaz de producir partículas virales infectivas, aunque con menor eficiencia, en concordancia con los resultados presentados en el Capítulo 2. El hecho de que dicho virus pueda infectar células sugiere que la proteína de cápside no es el blanco de ubiquitinación requerido para el desnudamiento.

Por último, los resultados aquí presentados muestran que la vida media del ARN viral que ingresa a la célula se incrementó de 3 a más de 10 horas en presencia del inhibidor de E1, apoyando la idea de que la ubiquitinación es necesaria para la liberación del genoma al citoplasma. Teniendo en cuenta que el inhibidor no impide la entrada del virus a la célula, y que el efecto en traducción se manifiesta sólo si el compuesto es agregado hasta 30 minutos post infección, se propone que la ubiquitinación sería necesaria en una ventana de tiempo acotada, que podría incluir la maduración del endosoma, fusión de membranas o durante el desensamblado de la nucleocápside. En resumen, la maquinaria de ubiquitinación es requerida en una etapa posterior a la entrada y previa a la traducción del DENV (Figura 73).

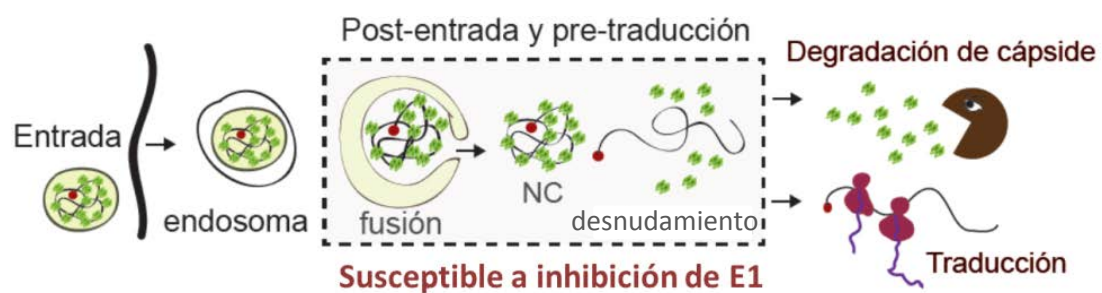


Figura 73. Esquema que ilustra los eventos tempranos del ciclo viral susceptibles a la inhibición de la maquinaria de ubiquitinación celular.

CONCLUSIONES FINALES

El DENV es un importante y creciente problema de salud pública en todo el mundo. En la región de las Américas se registraron cerca de 2 millones de casos de dengue en lo que va del año 2016 (OMS), y con la circulación de los 4 serotipos en la región, ha aumentado el riesgo de aparición de formas graves de la enfermedad. Asimismo, Argentina experimentó en el 2016 la peor epidemia de dengue de su historia. Esta situación hace que sea fundamental el desarrollo de nuevas estrategias de control. En la actualidad no se encuentran disponibles antivirales ni vacunas efectivas, limitando las acciones al control del mosquito vector y a medidas de protección individuales. Por lo tanto, el desarrollo de drogas terapéuticas o vacunas seguras y efectivas representa un desafío importante para combatir esta enfermedad.

Históricamente el foco en el desarrollo de antivirales estuvo centrado en las enzimas virales; sin embargo, la idea de que proteínas multifuncionales del virus podrían ser aún más vulnerables a la interferencia está comenzando a ganar fuerza. En este sentido, en los últimos años las proteínas de cápside de virus envueltos han emergido como blancos interesantes para el desarrollo de una nueva era de agentes antivirales (Klumpp and Crepin, 2014). Sin embargo, los procesos de encapsidación y desnudamiento de los flavivirus son prácticamente desconocidos.

Esta tesis se centró en el estudio de la proteína de cápside y su función en los procesos de encapsidación y desnudamiento del DENV. A lo largo de la misma se identificaron requerimientos de residuos básicos en la región de la hélice $\alpha 4$ de cápside. Esto permitió, junto con un trabajo previamente realizado en el laboratorio (Samsa et al., 2012), proponer un modelo en el cual tanto la región N-terminal desestructurada como la zona C-terminal contribuyen al reclutamiento del genoma viral para la formación de nuevas partículas, tal como se muestra en la Figura 74.

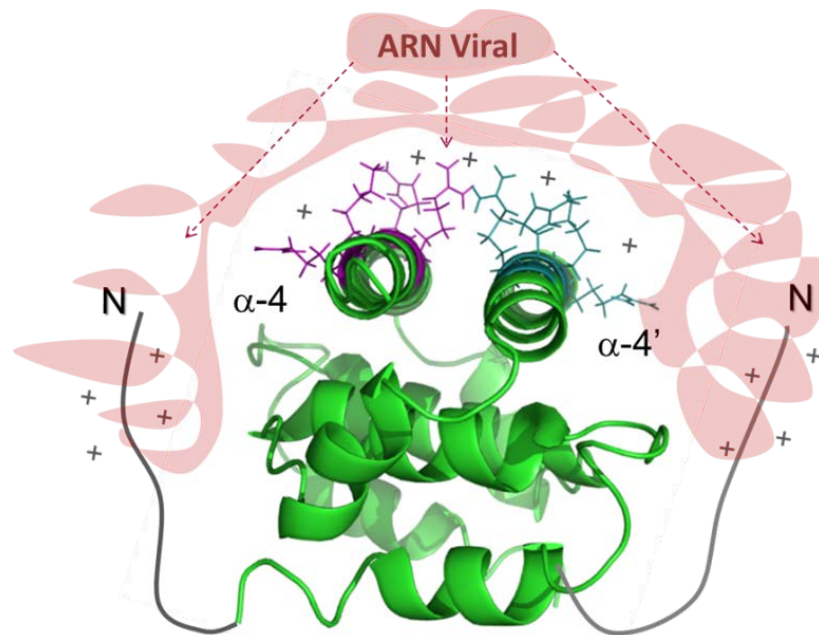


Figura 74. Modelo de interacción de un dímero de cápside con el genoma viral. La región N-terminal desestructurada y la zona de la hélice $\alpha 4$ son las responsables de compactar al ARN del virus.

Por otro lado, se identificaron por primera vez PTMs en la proteína de cápside de DENV. La presencia de distinto tipo de PTMs en cápside aislada de células o partículas virales podría indicar una selección particular de la proteína que se encapsida. Este hallazgo abre nuevas puertas para explorar el posible bloqueo de estas modificaciones en cápside que podrían inhibir la producción de partículas virales.

En esta tesis se estudió también el mecanismo de desnudamiento de DENV, y se demostró que la liberación al citoplasma del genoma durante el proceso de infección viral depende de la maquinaria celular de ubiquitinación, pero no de la actividad del proteasoma. Los resultados indican que la maquinaria de ubiquitinación es requerida en una etapa posterior a la entrada y previa a la traducción del virus, proporcionando una ventana de oportunidad para la inhibición viral.

Los procesos de encapsidación del genoma viral para la formación de nuevas partículas virales, y la infección de nuevas células dependen fuertemente de la interacción adecuada de cápside con otras subunidades de la proteína, como con otros factores virales y celulares. Si esto no ocurre correctamente, se compromete la adecuada temporalidad y espacialidad de la formación de la nucleocápside durante el ciclo viral en la célula infectada. Más aun, la cápside debe ser lo suficientemente estable como

para proteger al genoma viral en el ambiente extracelular, pero no demasiado estable como para evitar la liberación eficiente del genoma después de la entrada a la célula hospedadora. Es por esto que pequeñas interferencias en la capacidad de cápside para formar la nucleocápside, o en cambios en la estabilidad de las interacciones de la proteína, pueden impedir pasos críticos en los procesos de encapsidación y/o liberación del genoma viral (Klumpp and Crepin, 2014). En relación a esto, estudios recientes han descrito la identificación de moléculas pequeñas estructuralmente diversas con capacidad de inhibir la replicación viral, las cuales tienen como blanco los procesos de encapsidación y/o desnudamiento del genoma viral. Si bien la mayoría de los inhibidores dirigidos contra las proteínas de cápside se encuentran en una fase inicial de desarrollo, los mismos son muy promisorios ya que parecen tener la capacidad de unirse a muchos sitios en cápside, generando una gran variedad de mecanismos de inhibición viral. Además, el hecho de que las proteínas de cápside deban someterse a cambios conformacionales y presenten muchas interacciones diferentes a lo largo del ciclo viral dificulta el surgimiento y selección de virus resistentes a drogas. Hasta la fecha se han reportado inhibidores de estas características para HIV, HBV y DENV (Blair et al., 2010, Bourne et al., 2008, Byrd et al., 2013, Katen et al., 2013, Lamorte et al., 2013, Lemke et al., 2012, Scaturro et al., 2014).

Mediante una búsqueda de antivirales a gran escala, el laboratorio del Dr. Bartenschlager identificó una pequeña molécula denominada ST-148 que inhibe potentemente la replicación de los cuatro serotipos de DENV in vitro, teniendo como blanco a la proteína de cápside (Byrd et al., 2013). La caracterización del modo de acción de ST-148 demostró que el compuesto aumenta la interacción de cápside consigo misma, perturbando el ensamblado y desensamblado de la nucleocápside, probablemente mediante la inducción de rigidez estructural (Scaturro et al., 2014). Este hallazgo reciente demuestra que emplear a la proteína de capsido como blanco para antivirales es una estrategia factible para el caso de los flavivirus.

Uno de los problemas en el desarrollo de antivirales es la gran capacidad de los virus de ARN para adaptarse a nuevos ambientes y la consecuente aparición de virus resistentes. Dicho proceso requiere primero del surgimiento de variantes virales resistentes a la droga en la población, y luego que la presión de selección por el

tratamiento con la droga promueva su amplificación de manera selectiva. En la mayoría de los casos, la resistencia al compuesto es dominante; sin embargo, en algunos casos, los genomas susceptibles a la droga pueden ser dominantes. Esto puede ocurrir, por ejemplo, cuando el fármaco está dirigido contra una proteína que forma oligómeros, como es el caso de la proteína de cápside de DENV. En una célula en la cual surja un genoma resistente, el mismo necesariamente deberá coexistir con genomas virales susceptibles a la droga, conduciendo a la expresión de proteínas de cápside susceptibles y resistentes al compuesto. Por lo tanto, la nucleocápside contendrá subunidades de proteínas defectuosas y funcionales, generando un complejo no funcional. En relación a esto, ensayos realizados en células en cultivo infectadas no mostraron selección de virus resistentes a ST-148, a pesar de la presencia de variantes resistentes al compuesto en la población (Mateo et al., 2015).

Nuestros resultados aportan nueva información acerca de los procesos de encapsidación y desnudamiento del DENV, con el foco puesto en la proteína de cápside. Esperamos que el conocimiento aquí generado acerca de los puntos susceptibles de la proteína de cápside ayude al desarrollo racional de nuevas estrategias de control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clon infeccioso del DENV y DV-R

El clon infeccioso del DENV WT (pD2/ICAflIII), fue generosamente cedido al laboratorio por el Dr. Richard Kinney (Kinney et al., 1997). Este plásmido contiene el cDNA del genoma completo de DENV2, cepa 16681 y un promotor de la enzima ARN polimerasa T7, el cual permite generar el genoma viral de cadena simple y polaridad positiva mediante técnicas de transcripción *in vitro*. El número de acceso en GenBank de la secuencia de este virus es U87411.

El clon infeccioso del DV-R, fue construido en nuestro laboratorio utilizando el plásmido pD2/ICAflIII. Se agregó un sitio de corte único (NotI) en la posición 239 (pD2/ICNotI) con el fin de facilitar el clonado del gen reportero. Su diseño, construcción y caracterización forman parte de los resultados de la Tesis del Dr. Juan Mondotte (Figura 75).

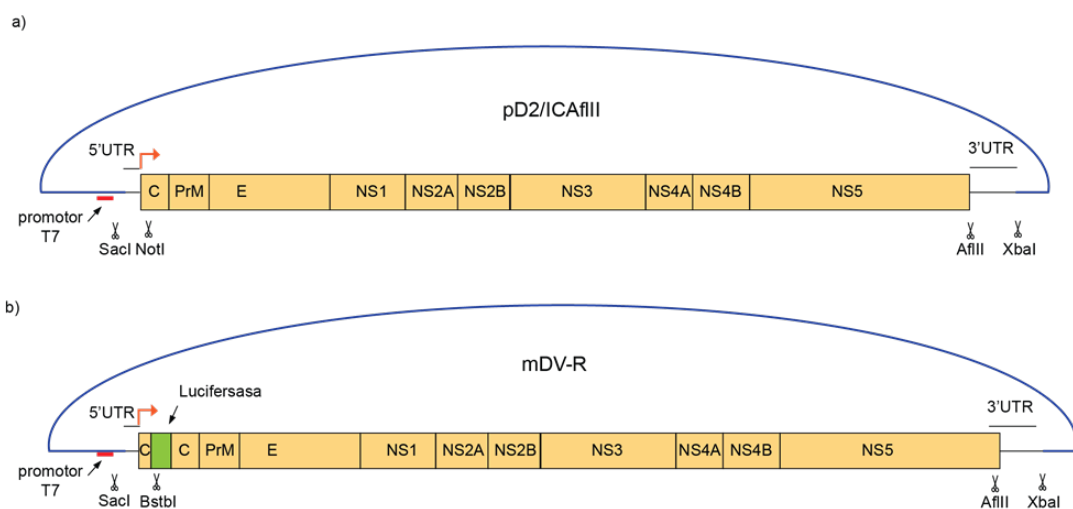


Figura 75. Herramientas utilizadas para la manipulación del genoma del DENV. **A.** Se presenta un mapa esquemático del plásmido pD2/ICAflIII. **B.** Se presenta un mapa esquemático del plásmido mDV-R. Se indica las enzimas de restricción que forman los casetes utilizados para intercambiar fragmentos de ADN con mutaciones. Se indican además la posición relativa del promotor T7 y el sitio de la traducción viral (flecha naranja).

Construcción de virus mutantes

La estrategia utilizada para introducir mutaciones dentro de la secuencia de DENV se basaron en el clonado de fragmentos generados a partir de reacciones de PCR por

solapamiento (overlapping-PCR). Los oligonucleótidos internos conteniendo la secuencia modificada en cada una de las hemi-PCRs se encuentran presentados en las Tablas 1 y 2 del Anexo. Los oligonucleótidos externos utilizados para la amplificación de la PCR por solapamiento se eligieron en base a la disponibilidad de sitios de restricción únicos por fuera de la región a modificar.

Los plásmidos utilizados como vector de destino (pD2/ICNotI o pD2/ICNot1-Rluc), y los productos de PCR conteniendo las mutaciones deseadas se digirieron con las enzimas de restricción especificadas en la Tabla 3 del Anexo. En algunos casos se clonó el producto de PCR en el vector pGEM-DVR-SacI/SphI; este vector se utilizó como plásmido intermedio para evitar la síntesis de fragmentos de PCR excesivamente largos, debido a la escasez de sitios de corte únicos en el vector de destino final. Las reacciones de digestión se realizaron en un volumen final de 30µl en el que se trataron 2µg de DNA sustrato en condiciones sugeridas por el proveedor. Los productos de digestión fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa junto con marcadores de peso molecular apropiados. Los productos de interés fueron cortados del gel y purificados mediante el kit de Qiagen, *Qiaquick Gel Extraction*.

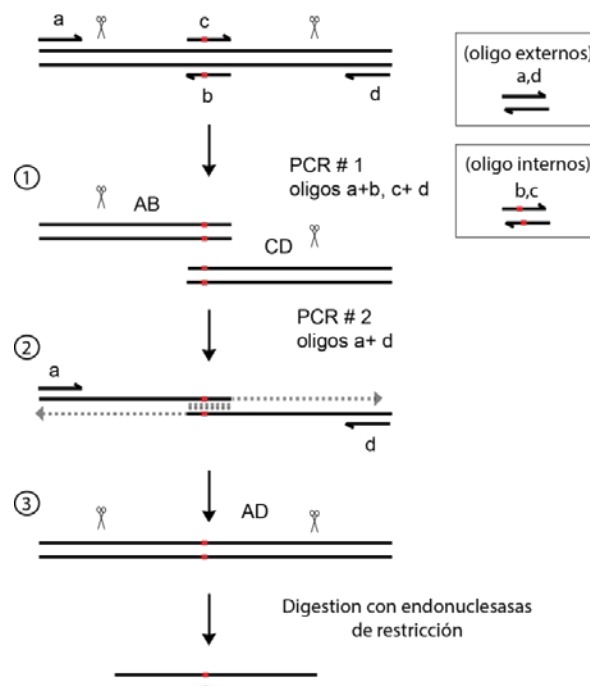


Figura 76. Manipulación del genoma viral para la generación de virus mutantes. Se presenta de manera esquemática los pasos llevados a cabo para realizar una PCR por solapamiento. **1.** Generación de PCRs con cambios en la secuencia introducidos a través de los oligonucleótidos internos. **2.** Amplificación de fragmentos solapados. **3.** Digestión con enzimas de restricción.

La ligación de estos productos se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando 3-5 U de enzima (T4 DNA ligasa, Invitrogen Life Technologies), según las especificaciones del proveedor. Por lo general se utilizaron 100ng del vector en relación molar 1:3 respecto del inserto, en un volumen final de 20µl.

Los productos de ligación fueron transformados en bacterias *Escherichia coli* XL-1 Blue mediante shock térmico según el método de Inoue (Sambrook and Russell, 2006). En general se incubaron 100µl de suspensión de bacterias con 10µl del producto de ligación en hielo durante 30 minutos. A continuación, se realizó un shock térmico a (90 segundos a 42°C), seguido por una incubación en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se procedió a la recuperación de las bacterias en 500µl de medio LB por 45 minutos a 37°C. La mezcla de transformación se centrifugó durante 5 minutos a 2000rpm, y el pellet bacteriano se resuspendió en LB para ser distribuido sobre placas de LB-agar con Ampicilina 100µg/ml. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C y al día siguiente se picaron colonias de bacterias para crecer cultivos líquidos de LB con Ampicilina 100µg/ml durante 16h a 37°C. La purificación del ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando el kit de Qiagen, *Qiaquick Plasmid Extraction*. Finalmente, se confirmó la introducción de las mutaciones deseadas mediante secuenciación de ADN.

Obtención de ARN genómico viral

Con el fin de obtener el molde lineal de ADN para la transcripción *in vitro*, se digirieron 10µg de ADN con 20 U la enzima Xba I en un volumen final de reacción de 50µl (el sitio único de corte de esta enzima se encuentra inmediatamente después del último nucleótido de la secuencia del virus). Luego de la digestión se extrajo el ADN de la mezcla de reacción con una parte de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 saturado con Tris 10 mM pH 8, 1 mM EDTA (Sigma # P3803). A continuación se tomó la fase acuosa y se agregaron 5µg de glicógeno, una décima parte de acetato de sodio 3M y tres partes de etanol absoluto. El ADN linealizado se precipitó por centrifugación y se resuspendió en 20µl de agua milliQ.

Se utilizó 1µg de molde de DNA lineal para cada reacción de transcripción *in vitro*, en un volumen final de 30µl. La reacción incluyó Buffer de reacción (Tris-HCl 40mM pH 7.5, MgCl₂ 10mM, DTT 10mM y BSA 50µg/ml), 50 U de T7 ARN polimerasa (Ambion #

2717), CTP, GTP y UTP 2mM, ATP 0.4mM y un análogo estructural de cap m7GpppA 2mM (New England Biolabs #1405). El tiempo de reacción de la transcripción fue de 2 horas a 37°C. En caso de ser necesario, el ADN utilizado como molde fue eliminado con DNasa I (Ambion #1906).

Líneas Celulares

La línea celular de riñón de hámster BHK-21 clon 15, se mantuvo en estufa a 37°C con 5% de CO₂, en medio mínimo esencial alfa (α-MEM, Gibco #11900-024) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco #16000-044), 100U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina (Gibco #15140-122).

La línea celular de carcinoma de pulmón humano A549, se mantuvo en estufa a 37°C con 5% de CO₂, el medio Dulbecco's Modified Eagle: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12 Gibco #12500-062) suplementado con 10% suero fetal bovino (Gibco #16000-044), 100U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina (Gibco #15140-122).

La línea celular de mosquito *Aedes albopictus* C6/36 HT fue adapta para crecer en estufa a 33°C con 5% de CO₂, en medio Leibovitz L-15 (Gibco #41300-039) suplementado con 10% suero fetal bovino (Gibco #16000-044), triptosa fosfato 0.3%, glutamina 0.02%, 100µM de aminoácidos no esenciales MEM (Gibco #11140-050), 250ng/ml de fungizona (Gibco), 100U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina (Gibco #15140-122).

Transfección de ARN genómico viral

Independientemente del formato de la placa de cultivo utilizada, en todas las líneas celulares las transfecciones se realizaron en monocapas celulares con una confluencia del 60-80%. La cantidad de ARN utilizado fue de 300-500ng cada 2x10⁵ células. Las transfecciones se llevaron a cabo utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen #1668). Las diluciones del ARN y de la lipofectamina, así como el inoculo de transfección, se realizaron en Opti-MEM I (Gibco #31985-070) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las transfecciones se realizaron por duplicado o triplicado y los experimentos se repitieron independientemente al menos dos veces.

Ensayos de inmunofluorescencia

Células BHK, A549 o C6/36 fueron crecidas en placas de 35mm de diámetro en las cuales previamente se depositó un vidrio de 12mm de diámetro (Starke #111520). Luego de haber transcurrido el tiempo indicado según el tipo de experimento (infección o transfección), las células fueron fijadas según el método de fijación deseado. Para la fijación con paraformaldehído (PFA), los vidrios con las células crecida en su superficie fueron sumergidos en una solución de paraformaldehído 4%, sacarosa 4% en PBS pH 7.4 durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Una vez fijadas, las células fueron permeabilizadas durante 4 minutos con una solución 0.1% de Tritón X-100 en PBS. Para la fijación con metanol, las células crecida en su superficie de los vidrios fueron sumergidas en metanol 95% durante 30 minutos a -20°C y luego se realizaron 3 lavados con PBS. Luego de los lavados, los preparados fueron bloqueados durante 30 minutos con una solución de bloqueo (gelatina 0.2% (Sigma #G9382) en PBS). Posteriormente los vidrios fueron incubados durante 1 hora sobre una gota de 30µl con la dilución del anticuerpo primario en la solución de bloqueo. Luego de realizar 5 lavados alternados con las soluciones de lavado y de bloqueo, se incubaron durante 1 hora sobre una gota de 30µl con la dilución del anticuerpo secundario en la solución de bloqueo. Luego de realizar 5 lavados alternados con las soluciones de lavado y de bloqueo se llevó a cabo las tinciones con DAPI. Para esta tinción de núcleos, los preparados fueron incubados durante 10 minutos sobre una gota de 30µl con una solución de 1µg/ml de DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) en PBS. Antes de proceder al montaje de los preparados se realizaron tres lavados con PBS. A continuación, se procedió al montaje de los preparados sobre una gota de 10µl de MOWIOL (2.5% 1,4-diazobicyclo-[2.2.2]-octane (DABCO, Sigma # D2522)). La descripción de los anticuerpos utilizados y la dilución a la cual fueron utilizados se detallan en la Tabla 4 del Anexo.

Microscopía

Las imágenes de inmunofluorescencia fueron adquiridas con un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Imager A.2 con una cámara Zeiss AxioCam MRc5.

Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas con un dispositivo Zeiss LSM axioplan Pascal. Para la excitación de los fluoróforos verdes (Alexa 488) se utilizó un láser de argón con un pico de emisión a 488nm. El fluoróforo rojo Cy3 se excitó con un láser de helio/neón con picos de emisión de 543nm. El análisis y la edición preliminar de las imágenes se realizaron con el software incorporado a la plataforma Zeiss, denominado "LSM Image Browser".

Stocks virales

Los stocks del virus del dengue WT (DV) o reportero (DV-R) fueron obtenidos a partir del sobrenadante de la transfección de los ARN genómicos WT o reportero en células C6/36 o BHK. Los virus obtenidos a partir de la transfección se amplificaron mediante un pasaje en células C6/36 para generar los stocks de virus que se conservaron a -70°C. El título de estos stocks se determinó mediante el ensayo de unidades formadoras de placas de lisis (UFP) en células BHK-21.

Cuantificación de partículas virales infectivas mediante UFP

La cuantificación de partículas virales infectivas presentes en los sobrenadantes de transfección o luego de una infección se realizó mediante el ensayo de unidades formadoras de placas de lisis (UFP). Utilizando un formato de placa de 24 pocillos, se plaquearon 3×10^4 células BHK por pocillo, 24 horas antes de comenzar con la determinación. El día del ensayo, células crecidas al 50-70% 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 con periodos de agitación cada 10 minutos. Luego se retiró el inóculo y se completó cada pocillo con 1 ml de α -MEM semisólido (α -MEM, metilcelulosa 0.8% (Sigma # M0512), 2% suero fetal bovino, 100U/ml penicilina y 100 μ g/ml estreptomycin). Las células se crecieron en estufa a 37°C por 7 días. A continuación, se fijaron con formaldehído 10% durante 45 minutos y se tiñeron con

solución de cristal violeta (cristal violeta 0.1% en etanol 20%). Finalmente, se cuantificaron las placas por conteo directo y el título viral se expresó como UFP/ml.

Ensayos de PCR en tiempo real

Para la cuantificación de ARN viral por RT-PCR en tiempo real, el ARN de partículas virales o células infectadas con el DENV, y tratadas o no con proteinasa K, se extrajo utilizando TRIzol (Invitrogen) a distintos tiempos post infección. Luego, dicho ARN utilizó como molde en una reacción de transcripción reversa (RT) en un volumen de reacción de 20µl utilizando 160 unidades de M-MLV (Promega), 4 unidades de inhibidor de ribonucleasa (Promega), 500 nM del primer AVG 572 (5'-ACCAAGGACTCCTGCCTCTCC-3'), 0.5 mM de cada dNTP, en Buffer M-MLV 1X. El primer y el ARN molde se pre-incubaron 5 minutos a 70°C. La reacción de retro-transcripción se dejó proceder durante 1 hora a 42°C, y luego 15 minutos a 65°C para desnaturalizar a la enzima. Para la PCR cuantitativa en tiempo real se empleó el equipo Mx3005P QPCR (Agilent Technologies Inc.). Las reacciones se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos utilizando 2µl de la reacción RT como molde (y diluciones 1:10 en agua libre de RNAsas), 5µl de FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 2× mix (Roche), 300 nM de cada primer (5'-GAATACACAGATTACATGCC-3' y AVG 572) y agua libre de RNAsas para llevar a 10µl. Las reacciones se realizaron con los siguientes parámetros: 95°C por 15 minutos, 40 repeticiones de 95°C durante 10 segundos y 60°C durante 30 segundos. La detección de fluorescencia fue adquirida durante la etapa de elongación en cada ciclo. En relación a las PCR cuantitativas de UBA1 y UBA3, los primers para la amplificación fueron (Fw 5'-GATTCATCGTGGCTGCATCCAAC-3' y Rev 5'-CTTG TAGGAGTCAAGCTGTCGGT-3') y UBA3 (Fw 5'-GATTCATCGTGGCTGCATCCAAC-3' y Rev 5'-CTACCCCTTGAGTGAGCCTATAC-3'). La retro-transcripción se realizó con hexa-random primers.

Medición de la actividad de luciferasa de renilla en extractos celulares

El formato de placa utilizado en los ensayos con el virus reportero fue de 24 pocillos, luego de transcurrido el tiempo indicado según el experimento, se determinó la actividad de luciferasa de renilla presente en el extracto celular. Para esto se utilizó el

kit Renilla Luciferase Assay System (Promega #E2810). Siguiendo las especificaciones del proveedor, se cuantificó la actividad luciferasa empleando un lector de luminiscencia Veritas (Turner BioSystems).

Fraccionamientos subcelulares

Las células fueron cosechadas por rastrillado con PBS frío y se centrifugaron a 1000g, 10 minutos a 4°C. El *pellet* celular se resuspendió en Buffer de lisis (Tris 50 mM pH 7.2; NaCl 25 mM; KCl 25mM; CaCl₂ 5mM; MgCl₂ 5mM; Tritón 0,1%), y se dejó 25 minutos en hielo. Luego, se centrifugó a 1000g, 10 minutos a 4°C y se separó el sobrenadante (fracción citoplasmática) del pellet (fracción nuclear). La fracción citoplasmática se centrifugó una vez más en las mismas condiciones y el pellet de este paso se incorporó al de la centrifugación anterior (fracción nuclear). A la fracción citoplasmática se le agregaron inhibidores de proteasas, DNAsas y RNAsas. La fracción nuclear se resuspendió en buffer (NaH₂PO₄ 50mM pH 7,5; NaCl 2M; inhibidor de proteasas; DTT 1mM; CHAPS 0.1%; Glicerol 20%; DNAsas y RNAsas), se sonicó y se centrifugó para descartar el debris celular.

Purificación de la proteína C

Se utilizaron 200mL de stock viral para la purificación de la proteína C de partículas de DENV. Los mismos fueron precipitados con PEG8000 8% durante 2 horas en hielo y centrifugados durante 1 hora a 15000g. Los pellets se resuspendieron en 2ml de buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50mM pH 7.5, NaCl 1M; mix antiproteolítico 1X, PMSF 1mg/ml, DTT 1mM, CHAPS 0.1%, Glicerol 20% RNAsa A 100µg/ml); posteriormente el extracto lisado fue llevado a 20ml con NaH₂PO₄ 50mM pH 7.5 y fue filtrado a través de una membrana de 0,45µm (Millipore). Este extracto clarificado fue sembrado en una columna de heparina de 1ml (HiTrap Heparin HP, GE Healthcare), conectada a un equipo FPLC y previamente equilibrada en buffer (NaH₂PO₄ 50mM pH 7.5, Glicerol 2%, β-Mercapto 10mM). Utilizando un flujo de 1ml/min, se dejó eluir el frente de corrida y se lavó la columna con 15 volúmenes de buffer. La fracción de proteína de cápside se eluyó mediante un gradiente de NaCl 0,2-2M en buffer (NaH₂PO₄ 50mM pH 7,5; Glicerol 2%; β-Mercapto 10mM). El pico de elución de la proteína se observó a NaCl 1,5M.

Dot Blot y Slot Blot

Por este método se analizaron las fracciones eluidas de la columna de heparina empleada para purificar proteína C, y las distintas etapas del procedimiento. Los stocks virales fueron tratados con buffer de lisis (NaH_2PO_4 50mM pH 7,5; NaCl 2M; inhibidor de proteasas; DTT 1mM; CHAPS 0.1%; Glicerol 20%; DNAsas y RNAsas). Las muestras se sembraron en una membrana de nitrocelulosa (Protran® Whatman) contenida en el equipo Bio-Dot® SF Microfiltration (Bio Rad). La membrana se bloqueó toda la noche a 4°C con leche 5% en TBS-Tween 0,1%. Luego se la incubó con un anticuerpo primario policlonal anti-cápside hecho en conejo durante 90 minutos a temperatura ambiente, diluido en solución de bloqueo. A continuación, la membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween 0,1% y se incubó con el anticuerpo secundario hecho en cabra, anti-conejo fusionado a HRP (Sigma-Aldrich) durante 90 minutos a temperatura ambiente, diluido en solución de bloqueo. Nuevamente, se lavó la membrana y se reveló en placa radiográfica (Amersham) utilizando el reactivo ECL Prime (GE).

Mediciones MALDI

Las muestras de proteína C purificada se precipitaron con TCA para concentrar y remover las sales, se corrieron en SDS-PAGE 15%. El gel se tiñó con Coomassie blue y se escindieron las bandas a analizar por espectrometría de masa. Los tacos de gel fueron tratados con tripsina a 37 °C para extraer los péptidos de cada banda y luego fueron analizados en un espectrómetro de masa 4800 MALDI TOF/TOF (Abi Sciex) o en un espectrómetro de masa LTQ Velos acoplado a un nano-LC (Easy nano LC 100, Thermo).

Western Blots

Para la detección de la proteína C en extractos de células A549, BHK o C6/36, las células fueron cosechadas en el tiempo post infección o transfección indicado en cada experimento, se lavaron con PBS y se trataron (cuando se especifica) con proteinasa K durante 45 minutos a 4 ° C. La proteinasa K se inactivó y las células se lisaron usando Buffer H (HEPES 10 mM, pH 7,9; KCl 50 mM; 2 mM EDTA; 0,5 mM PMSF; 1 mM DTT;

0,5 mM Triton X-100). Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE 15%, y luego de la corrida fueron transferidas a una membrana de PVDF (Amersham) (1hs, 70mA). La membrana se bloqueó toda la noche a 4°C con leche 5% en TBS-Tween 0,1%. Luego se la incubó con un anticuerpo primario policlonal anti-cápside hecho en conejo durante 90 minutos a temperatura ambiente, diluido en solución de bloqueo. Dicho anticuerpo fue obtenido en nuestro laboratorio (Samsa et al., 2009). A continuación, la membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween 0,1% y se incubó con el anticuerpo secundario hecho en cabra, anti-conejo fusionado a HRP (Sigma-Aldrich) durante 90 minutos a temperatura ambiente, diluido en solución de bloqueo. Nuevamente, se lavó la membrana y se reveló en placa radiográfica (Amersham) utilizando el reactivo ECL Prime (GE).

Ensayos de interferencia con ARNi

Los experimentos con ARN de interferencia se realizaron utilizando oligonucleótidos ON-TARGET plus SMART pool siRNA (DharmaconRNA Technologies). Los ARNi fueron dirigidos contra UBA1 (7317) y UBA3 (9039). El control utilizado fue un ARNi dirigido contra la luciferasa de Renilla, y el ARNi no relacionado contra la luciferasa de Firefly. Las células A549 se transfectaron con el ARNi correspondiente utilizando Oligofectamina (Invitrogen) 24 horas después de haber sido plaqueadas en placas de 24 pocillos. Brevemente, 25 pmol de ARNi en 50 µL de Opti-MEM (Invitrogen) se mezclaron con 2 µL de Oligofectamina en 50 µL de Opti-MEM, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió a células A549 en un 50% de confluencia y se incubó toda la noche. Al día siguiente, el medio se reemplazó por DMEM F12 con 10% de suero fetal bovino. A las 48 horas luego de la transfección, las células fueron infectadas con un stock de virus reportero y la actividad luciferasa se midió a las 6 ó 48 horas post infección.

Tratamiento con Proteinasa K

Las células infectadas fueron lavadas tres veces con PBS frío y se trataron con 1 mg/ml de proteinasa K (Invitrogen) durante 45 min a 4 °C para remover el virus adsorbido no internalizado. Luego, se incorporó PMSF 2 mM en PBS conteniendo 3 % de BSA para bloquear la acción enzimática de la proteinasa K. A continuación, las células se centrifugaron y se resuspendieron en Buffer H. Las muestras se guardaron a -70°C hasta su evaluación por western blot.

Ensayos de inhibición

Los compuestos fueron agregados a las células 15 minutos antes de la infección (a menos que en el experimento se indique específicamente otro tiempo), y fueron mantenidos hasta la toma de muestra ya sea para western blot, PCR en tiempo real o medición de actividad luciferasa luego de infección con el virus reportero. Las concentraciones empleadas de los compuestos fueron: 20 µM MG132 (Sigma-Aldrich), 75 µg/mL Cicloheximida (Sigma-Aldrich), 75 µM UBEI 41 (Sigma-Aldrich) y 5 µM DBeQ (Sigma-Aldrich).

ANEXOS

Tabla 1 Anexo. Descripción de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR por solapamiento. La secuencia de los oligonucleótidos se describe en la Tabla 2 de este anexo.

Mutante	Oligonucleótidos			
	Hemi-PCR 1		Hemi-PCR 2	
	Sentido	Antisentido	Sentido	Antisentido
K67R68A	AVG 799	AVG 448	AVG 595	AVG 800
K73K74K76A	AVG 801	AVG 448	AVG 595	AVG 802
R82R85K86R90A	AVG 1399	AVG 448	AVG 595	AVG 1400
K73K74A	AVG 1387	AVG 448	AVG 595	AVG 1388
K74K76A	AVG 1616	AVG 448	AVG 595	AVG 1617
K73A	AVG 1383	AVG 448	AVG 595	AVG 1384
K74A	AVG 1385	AVG 448	AVG 595	AVG 1386
K76A	AVG 1288	AVG 448	AVG 595	AVG 1289
R85K86A	AVG 1397	AVG 448	AVG 595	AVG 1398
R82A	AVG 1389	AVG 448	AVG 595	AVG 1390
R85A	AVG 1391	AVG 448	AVG 595	AVG 1392
K86A	AVG 1393	AVG 448	AVG 595	AVG 1394
R90A	AVG 1395	AVG 448	AVG 595	AVG 1396
S24T25A	AVG 1213	AVG 488	AVG 595	AVG 1214
S34A	AVG 1215	AVG 488	AVG 595	AVG 1216
K31A	AVG 1290	AVG 488	AVG 595	AVG 1291
K73R	AVG 1614	AVG 448	AVG 595	AVG 1615
KxR Tramo 1	AVG 1786	AVG 488	AVG 595	AVG 1787
KxR Tramo 2	AVG 1788	AVG 488	AVG 595	AVG 1789
KxR Tramo 3	AVG 1790	AVG 448	AVG 595	AVG 1791

Tabla 2 Anexo. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para realizar las mutantes de cápside o PCRs de UBA1 y UBA3.

PRIMER	SECUENCIA 5' -> 3'
AVG 448	CGTTCTTGGAGAGCACTCC
AVG 488	ATGGAAGGATCCTCATTACGCCATCACTGTTGGAATCAGC
AVG 595	GTGATGATTTACCAAAAATGTTTATTGAATCGG
AVG 799	GCAGGGATATTGGCGGCCTGGGGAACAATTA AAAAATCAAAGC
AVG 800	TTAATTGTTCCCGAGGCCGCAATATCCCTGCTGTTGGTGGG
AVG 801	GGAACAATTGCGGCCTCAGCGGCTATTAATGTTTTGAGAGGG
AVG 802	ACATTAATAGCCGCTGAGGCCGCAATTGTTCCCATCTCTTC
AVG 1213	CGCGAGAGAAACCGCGTGGCGGCTGTGCAACAGCTGACAAAG
AVG 1214	CTTTGTCAGCTGTTGCACAGCCGCCACGCGTTTTCTCTCGCG
AVG 1215	GCAACAGCTGACAAAGAGATTGCACTTGAATGCTGCAGG
AVG 1216	CCTGCAGCATTCCAAGTGCGAATCTTTGTCAGCTGTTGC
AVG 1288	GGAACAATTA AAAAATCAGCGGCTATTAATGTTTTGAGAGGG
AVG 1289	CCCTCTAAAACATTAATAGCCGCTGATTTTTTAATTGTTCC
AVG 1290	ACTGTGCAACAGCTGACAGCGAGATTCTCACTTGAATGCTG
AVG 1291	CAGCATTCCAAGTGAGAATCTCGCTGTCAGCTGTTGCACAGT
AVG 1383	GGAACAATTGCGAAATCAAAGCTATTAATGTTTTGAGAGGG
AVG 1384	CATTAATAGCTTTTGATTTGCAATTGTTCCCATCTCTTC
AVG 1385	GGAACAATTAAGCCTCAAAGCTATTAATGTTTTGAGAGGG
AVG 1386	CATTAATAGCTTTTGAGGCTTTAATTGTTCCCATCTCTTC
AVG 1387	GGAACAATTGCGGCCTCAAAGCTATTAATGTTTTGAGAGGG
AVG 1388	CATTAATAGCTTTTGAGGCCGCAATTGTTCCCATCTCTTC
AVG 1389	GCTATTAATGTTTTGGCGGGTTCAGGAAAGAGATTGGAAGG
AVG 1390	CCTCCAATCTTTCTGAAACCCCGCCAAAACATTAATAGC
AVG 1391	GCTATTAATGTTTTGAGAGGGTTCGCGAAAGAGATTGGAAGGATGCTGAAC
AVG 1392	G TTCAGCATCCTTCCAATCTTTTCGCGAACCTCTCAAACATTAATAGC
AVG 1393	GCTATTAATGTTTTGAGAGGGTTCAGGGCCGAGATTGGAAGGATGCTGAAC
AVG 1394	G TTCAGCATCCTTCCAATCTCGGCCCTGAACCCTCTCAAACATTAATAGC
AVG 1395	GCTATTAATGTTTTGAGAGGGTTCAGGAAAGAGATTGGAGCGATGCTGAAC
AVG 1396	G TTCAGCATCGCTCCAATCTTTCTGAAACCTCTCAAACATTAATAGC
AVG 1397	GCTATTAATGTTTTGAGAGGGTTCGCGGCCGAGATTGGAAGGATGCTGAAC
AVG 1398	CAGCATCCTTCCAATCTCGGCCGCAACCCTCTCAAACATTAATAGC
AVG 1399	GCTATTAATGTTTTGGCGGGTTCGCGGCCGAGATTGGAGCGATGCTGAAC
AVG 1400	G TTCAGCATCGCTCCAATCTCGGCCGCAACCCCGCCAAAACATTAATAGC
AVG 1614	GGAACAATTAGGAAATCAAAGCTATTAATGTTTTGAGAGGG
AVG 1615	CATTAATAGCTTTTGATTTCTAATTGTTCCCATCTCTTC
AVG 1616	GGAACAATTAAGCCTCAGCCGCTATTAATGTTTTGAGAGGG
AVG 1617	CATTAATAGCGGCTGAGGCTTAATTGTTCCCATCTCTTC
AVG 1786	CAACGGAGAAGAGCGAGAAACACGCCTTCAATATGCTGAGACGCGAGAG
AVG 1787	CTCTCGCTCTCAGCATATTGAAAGGCGTGTCTCTCGCTTTCTCCGTTGG
AVG 1788	GACAAGAAGATTCTCACTTGAATGCTGCAGGGACGAGGACCATTAAGACTGTTTCATG

AVG 1789	CATGAACAGTCTTAATGGTCCTCGTCCCTGCAGCATTCCAAGTGAGAATCTTCTTGTC
AVG 1790	GGAACAATTAGAAGATCAAGAGCTATTAATGTTTTGAGAGGGTTCAGGAGAGAGATTG
AVG 1791	CAATCTCTCTCTGAACCCTCTCAAACATTAATAGCTCTTGATCTTCTAATTGTTCC
AVG1973	GATTCATCGTGGCTGCATCCAAC (Primer UBA1 Sentido)
AVG1974	CTTGTAGGAGTCAAGCTGTCGGT (Primer UBA1 Antisentido)
AVG1977	CAGGCTACCAGAACACTGTATTGAG (Primer UBA3 Sentido)
AVG1978	CTACCCCTTGAGTGAGCCTATAC (Primer UBA3 Antisentido)

Tabla 3 Anexo. Enzimas de restricción utilizadas para realizar las mutantes de cápside.

Mutante	Enzimas	Vector intermedio	Enzimas	Vector final	
K67R68A			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
K73K74K76A			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
R82R85K86R90A			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
K73K74A			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
K74K76A			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
K73A			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
K74A			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
K76A			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
R85K86A			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
R82A			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
R85A			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
K86A			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
R90A			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
S24T25A	HindIII/NotI	pGEM-DVR-SacI/SphI	SacI/NotI	pD2/ICAFIII	DV-R
S34A	HindIII/NotI	pGEM-DVR-SacI/SphI	SacI/NotI	pD2/ICAFIII	DV-R
K31A	HindIII/NotI	pGEM-DVR-SacI/SphI	SacI/NotI	pD2/ICAFIII	DV-R
K73R			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R
KxR Tramo 1	HindIII/NotI	pGEM-DVR-SacI/SphI	SacI/NotI	pD2/ICAFIII	DV-R
KxR Tramo 2	HindIII/NotI	pGEM-DVR-SacI/SphI	SacI/NotI	pD2/ICAFIII	DV-R
KxR Tramo 3			NotI/SphI	pD2/ICAFIII	DV-R

Tabla 4 Anexo. Anticuerpos utilizados durante la tesis.

Ensayo	Anticuerpo primario		Anticuerpo secundario	
	Nombre/origen	Dilución	Nombre/origen	Dilución
IF	α Envoltura/Ratón	1/200	α Ratón-Alexa488/Cabra	1/500
IF	α Cápside/Conejo	1/500	α Conejo-Cy3/Cabra	1/500
WB	α Cápside/Conejo	1/1200	α Conejo-HRP/Cabra	1/3000
WB	α Acetil-lisina/Conejo	1/1000	α Conejo-HRP/Cabra	1/3000
WB	α Fosfo-serina/Ratón	1/1000	α Ratón-HRP/Cabra	1/2000

REFERENCIAS

1. Acosta, E.G., Castilla, V., and Damonte, E.B. (2008) Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *The Journal of general virology* 89, 474-484.
2. Acosta, E.G., Castilla, V., and Damonte, E.B. (2009) Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cellular microbiology* 11, 1533-1549.
3. Acosta, E.G., Castilla, V., and Damonte, E.B. (2012) Differential requirements in endocytic trafficking for penetration of dengue virus. *PLoS one* 7, e44835.
4. Alvarez, D.E., De Lella Ezcurra, A.L., Fucito, S., and Gamarnik, A.V. (2005a) Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* 339, 200-212.
5. Alvarez, D.E., Lodeiro, M.F., Luduena, S.J., Pietrasanta, L.I., and Gamarnik, A.V. (2005b) Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *Journal of virology* 79, 6631-6643.
6. Amberg, S.M., Nestorowicz, A., McCourt, D.W., and Rice, C.M. (1994) NS2B-3 proteinase-mediated processing in the yellow fever virus structural region: in vitro and in vivo studies. *Journal of virology* 68, 3794-3802.
7. Banerjee, I., Miyake, Y., Nobs, S.P., Schneider, C., Horvath, P., Kopf, M., . . . Yamauchi, Y. (2014) Influenza A virus uses the aggresome processing machinery for host cell entry. *Science* 346, 473-477.
8. Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., . . . Hay, S.I. (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, 504-507.
9. Bhuvanankantham, R., Cheong, Y.K., and Ng, M.L. (2010) West Nile virus capsid protein interaction with importin and HDM2 protein is regulated by protein kinase C-mediated phosphorylation. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 12, 615-625.
10. Blair, W.S., Pickford, C., Irving, S.L., Brown, D.G., Anderson, M., Bazin, R., . . . Butler, S.L. (2010) HIV capsid is a tractable target for small molecule therapeutic intervention. *PLoS pathogens* 6, e1001220.
11. Bourne, C., Lee, S., Venkataiah, B., Lee, A., Korba, B., Finn, M.G., and Zlotnick, A. (2008) Small-molecule effectors of hepatitis B virus capsid assembly give insight into virus life cycle. *Journal of virology* 82, 10262-10270.
12. Bulich, R. and Aaskov, J.G. (1992) Nuclear localization of dengue 2 virus core protein detected with monoclonal antibodies. *The Journal of general virology* 73 (Pt 11), 2999-3003.
13. Byk, L.A. and Gamarnik, A.V. (2016) Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annual review of virology* 3, 263-281.
14. Byrd, C.M., Dai, D., Grosenbach, D.W., Berhanu, A., Jones, K.F., Cardwell, K.B., . . . Jordan, R. (2013) A novel inhibitor of dengue virus replication that targets the capsid protein. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57, 15-25.
15. Cahour, A., Falgout, B., and Lai, C.J. (1992) Cleavage of the dengue virus polyprotein at the NS3/NS4A and NS4B/NS5 junctions is mediated by viral protease NS2B-NS3, whereas NS4A/NS4B may be processed by a cellular protease. *Journal of virology* 66, 1535-1542.
16. Clarke, B.D., Roby, J.A., Slonchak, A., and Khromykh, A.A. (2015) Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. *Virus research* 206, 53-61.
17. Clyde, K., Barrera, J., and Harris, E. (2008) The capsid-coding region hairpin element (cHP) is a critical determinant of dengue virus and West Nile virus RNA synthesis. *Virology* 379, 314-323.

18. Colpitts, T.M., Barthel, S., Wang, P., and Fikrig, E. (2011) Dengue virus capsid protein binds core histones and inhibits nucleosome formation in human liver cells. *PLoS one* 6, e24365.
19. Cui, T., Sugrue, R.J., Xu, Q., Lee, A.K., Chan, Y.C., and Fu, J. (1998) Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology* 246, 409-417.
20. Chapman, E.G., Moon, S.L., Wilusz, J., and Kieft, J.S. (2014) RNA structures that resist degradation by Xrn1 produce a pathogenic Dengue virus RNA. *eLife* 3, e01892.
21. Chen, R. and Vasilakis, N. (2011) Dengue--quo tu et quo vadis? *Viruses* 3, 1562-1608.
22. Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., and Marks, R.M. (1997) Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature medicine* 3, 866-871.
23. Cheong, Y.K. and Ng, M.L. (2011) Dephosphorylation of West Nile virus capsid protein enhances the processes of nucleocapsid assembly. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 13, 76-84.
24. de Borba, L., Villordo, S.M., Iglesias, N.G., Filomatori, C.V., Gebhard, L.G., and Gamarnik, A.V. (2015) Overlapping local and long-range RNA-RNA interactions modulate dengue virus genome cyclization and replication. *Journal of virology* 89, 3430-3437.
25. Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirisakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., . . . Screaton, G. (2010) Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 328, 745-748.
26. Durbin, A.P., Whitehead, S.S., Shaffer, D., Elwood, D., Wanionek, K., Thumar, B., . . . Schmidt, A.C. (2011) A single dose of the DENV-1 candidate vaccine rDEN1Delta30 is strongly immunogenic and induces resistance to a second dose in a randomized trial. *PLoS neglected tropical diseases* 5, e1267.
27. Egloff, M.P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J.L., and Canard, B. (2002) An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *The EMBO journal* 21, 2757-2768.
28. Enchev, R.I., Schulman, B.A., and Peter, M. (2015) Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases. *Nature reviews. Molecular cell biology* 16, 30-44.
29. Falgout, B. and Markoff, L. (1995) Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *Journal of virology* 69, 7232-7243.
30. Falgout, B., Pethel, M., Zhang, Y.M., and Lai, C.J. (1991) Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of virology* 65, 2467-2475.
31. Falkenberg, K.J. and Johnstone, R.W. (2014) Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature reviews. Drug discovery* 13, 673-691.
32. Fernandez-Garcia, M.D., Meertens, L., Bonazzi, M., Cossart, P., Arenzana-Seisdedos, F., and Amara, A. (2011) Appraising the roles of CBLL1 and the ubiquitin/proteasome system for flavivirus entry and replication. *Journal of virology* 85, 2980-2989.
33. Filomatori, C.V., Lodeiro, M.F., Alvarez, D.E., Samsa, M.M., Pietrasanta, L., and Gamarnik, A.V. (2006) A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes & development* 20, 2238-2249.
34. Friebe, P., Shi, P.Y., and Harris, E. (2011) The 5' and 3' downstream AUG region elements are required for mosquito-borne flavivirus RNA replication. *Journal of virology* 85, 1900-1905.

35. Gaunt, M.W., Sall, A.A., de Lamballerie, X., Falconar, A.K., Dzhivanian, T.I., and Gould, E.A. (2001) Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *The Journal of general virology* 82, 1867-1876.
36. Gebhard, L.G., Filomatori, C.V., and Gamarnik, A.V. (2011) Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses* 3, 1739-1756.
37. Gebhard, L.G., Iglesias, N.G., Byk, L.A., Filomatori, C.V., De Maio, F.A., and Gamarnik, A.V. (2016) A Proline-Rich N-Terminal Region of the Dengue Virus NS3 Is Crucial for Infectious Particle Production. *Journal of virology* 90, 5451-5461.
38. Gillespie, L.K., Hoenen, A., Morgan, G., and Mackenzie, J.M. (2010) The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *Journal of virology* 84, 10438-10447.
39. Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., and Blinov, V.M. (1989) Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic acids research* 17, 4713-4730.
40. Greene, W., Zhang, W., He, M., Witt, C., Ye, F., and Gao, S.J. (2012) The ubiquitin/proteasome system mediates entry and endosomal trafficking of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in endothelial cells. *PLoS pathogens* 8, e1002703.
41. Halstead, S.B. (1974) Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 23, 974-982.
42. Halstead, S.B., Nimmannitya, S., and Cohen, S.N. (1970) Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *The Yale journal of biology and medicine* 42, 311-328.
43. Halstead, S.B. and Russell, P.K. (2016) Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. *Vaccine* 34, 1643-1647.
44. Huotari, J., Meyer-Schaller, N., Hubner, M., Stauffer, S., Katheder, N., Horvath, P., . . . Peter, M. (2012) Cullin-3 regulates late endosome maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 823-828.
45. Iglesias, N.G., Mondotte, J.A., Byk, L.A., De Maio, F.A., Samsa, M.M., Alvarez, C., and Gamarnik, A.V. (2015) Dengue Virus Uses a Non-Canonical Function of the Host GBF1-Arf-COPI System for Capsid Protein Accumulation on Lipid Droplets. *Traffic* 16, 962-977.
46. Junjhon, J., Edwards, T.J., Utaipat, U., Bowman, V.D., Holdaway, H.A., Zhang, W., . . . Sittisombut, N. (2010) Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. *Journal of virology* 84, 8353-8358.
47. Kanlaya, R., Pattanakitsakul, S.N., Sinchaikul, S., Chen, S.T., and Thongboonkerd, V. (2010) The ubiquitin-proteasome pathway is important for dengue virus infection in primary human endothelial cells. *Journal of proteome research* 9, 4960-4971.
48. Katen, S.P., Tan, Z., Chirapu, S.R., Finn, M.G., and Zlotnick, A. (2013) Assembly-directed antivirals differentially bind quasiequivalent pockets to modify hepatitis B virus capsid tertiary and quaternary structure. *Structure* 21, 1406-1416.
49. Khromykh, A.A., Meka, H., Guyatt, K.J., and Westaway, E.G. (2001) Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *Journal of virology* 75, 6719-6728.
50. Khromykh, A.A. and Westaway, E.G. (1996) RNA binding properties of core protein of the flavivirus Kunjin. *Archives of virology* 141, 685-699.
51. Kiermayr, S., Kofler, R.M., Mandl, C.W., Messner, P., and Heinz, F.X. (2004) Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. *Journal of virology* 78, 8078-8084.
52. Kinney, R.M., Butrapet, S., Chang, G.J., Tsuchiya, K.R., Roehrig, J.T., Bhamarapavati, N., and Gubler, D.J. (1997) Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* 230, 300-308.

53. Klumpp, K. and Crepin, T. (2014) Capsid proteins of enveloped viruses as antiviral drug targets. *Current opinion in virology* 5, 63-71.
54. Kofler, R.M., Heinz, F.X., and Mandl, C.W. (2002) Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. *Journal of virology* 76, 3534-3543.
55. Kofler, R.M., Leitner, A., O'Riordain, G., Heinz, F.X., and Mandl, C.W. (2003) Spontaneous mutations restore the viability of tick-borne encephalitis virus mutants with large deletions in protein C. *Journal of virology* 77, 443-451.
56. Koonin, E.V. (1991) The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *The Journal of general virology* 72 (Pt 9), 2197-2206.
57. Koonin, E.V. (1993) Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *The Journal of general virology* 74 (Pt 4), 733-740.
58. Krishnan, M.N., Ng, A., Sukumaran, B., Gilfoy, F.D., Uchil, P.D., Sultana, H., . . . Fikrig, E. (2008) RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* 455, 242-245.
59. Krishnan, M.N., Sukumaran, B., Pal, U., Agaisse, H., Murray, J.L., Hodge, T.W., and Fikrig, E. (2007) Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *Journal of virology* 81, 4881-4885.
60. Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G., Pletnev, S.V., Corver, J., Lenches, E., . . . Strauss, J.H. (2002) Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108, 717-725.
61. Lamorte, L., Titolo, S., Lemke, C.T., Goudreau, N., Mercier, J.F., Wardrop, E., . . . Mason, S.W. (2013) Discovery of novel small-molecule HIV-1 replication inhibitors that stabilize capsid complexes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57, 4622-4631.
62. Lanford, R.E., Notvall, L., Chavez, D., White, R., Frenzel, G., Simonsen, C., and Kim, J. (1993) Analysis of hepatitis C virus capsid, E1, and E2/NS1 proteins expressed in insect cells. *Virology* 197, 225-235.
63. Lemke, C.T., Titolo, S., von Schwedler, U., Goudreau, N., Mercier, J.F., Wardrop, E., . . . Mason, S.W. (2012) Distinct effects of two HIV-1 capsid assembly inhibitor families that bind the same site within the N-terminal domain of the viral CA protein. *Journal of virology* 86, 6643-6655.
64. Lindenbach, B.D., Thiel, H.J., and Rice, C.M. (2007) Flaviviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology* (Knipe, D.M. and Howley, P.M., eds), Lippincott Williams & Wilkins.
65. Lindenbach, B.D., Thiel, H.J., and Rice, C.M. (2013) Flaviviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology* (Knipe, D.M. and Howley, P.M., eds), Lippincott Williams & Wilkins.
66. Liu, Z.Y., Li, X.F., Jiang, T., Deng, Y.Q., Zhao, H., Wang, H.J., . . . Qin, C.F. (2013) Novel cis-acting element within the capsid-coding region enhances flavivirus viral-RNA replication by regulating genome cyclization. *Journal of virology* 87, 6804-6818.
67. Lo, M.K., Tilgner, M., Bernard, K.A., and Shi, P.Y. (2003) Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3' untranslated region of West Nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication. *Journal of virology* 77, 10004-10014.
68. Lozach, P.Y., Burleigh, L., Staropoli, I., Navarro-Sanchez, E., Harriague, J., Virelizier, J.L., . . . Amara, A. (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. *The Journal of biological chemistry* 280, 23698-23708.

69. Lu, W. and Ou, J.H. (2002) Phosphorylation of hepatitis C virus core protein by protein kinase A and protein kinase C. *Virology* 300, 20-30.
70. Ma, L., Jones, C.T., Groesch, T.D., Kuhn, R.J., and Post, C.B. (2004) Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3414-3419.
71. Mackenzie, J.M., Jones, M.K., and Young, P.R. (1996) Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 220, 232-240.
72. Mateo, R., Nagamine, C.M., and Kirkegaard, K. (2015) Suppression of Drug Resistance in Dengue Virus. *mBio* 6.
73. Mercer, J., Snijder, B., Sacher, R., Burkard, C., Bleck, C.K., Stahlberg, H., . . . Helenius, A. (2012) RNAi screening reveals proteasome- and Cullin3-dependent stages in vaccinia virus infection. *Cell reports* 2, 1036-1047.
74. Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Buhler, S., and Bartenschlager, R. (2007) The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *The Journal of biological chemistry* 282, 8873-8882.
75. Miller, S., Sparacio, S., and Bartenschlager, R. (2006) Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *The Journal of biological chemistry* 281, 8854-8863.
76. Miorin, L., Romero-Brey, I., Maiuri, P., Hoppe, S., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., and Marcello, A. (2013) Three-dimensional architecture of tick-borne encephalitis virus replication sites and trafficking of the replicated RNA. *Journal of virology* 87, 6469-6481.
77. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S.C. (2004) Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313-319.
78. Mosso, C., Galvan-Mendoza, I.J., Ludert, J.E., and del Angel, R.M. (2008) Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* 378, 193-199.
79. Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews. Microbiology* 3, 13-22.
80. Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.L., . . . Despres, P. (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 reports* 4, 723-728.
81. Nayak, V., Dessau, M., Kucera, K., Anthony, K., Ledizet, M., and Modis, Y. (2009) Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. *Journal of virology* 83, 4338-4344.
82. Olsen, D.B., Eldrup, A.B., Bartholomew, L., Bhat, B., Bosserman, M.R., Ceccacci, A., . . . Carroll, S.S. (2004) A 7-deaza-adenosine analog is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication with excellent pharmacokinetic properties. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 3944-3953.
83. Osorio, J.E., Partidos, C.D., Wallace, D., and Stinchcomb, D.T. (2015) Development of a recombinant, chimeric tetravalent dengue vaccine candidate. *Vaccine* 33, 7112-7120.
84. Patkar, C.G., Jones, C.T., Chang, Y.H., Warriar, R., and Kuhn, R.J. (2007) Functional requirements of the yellow fever virus capsid protein. *Journal of virology* 81, 6471-6481.
85. Perera, R. and Kuhn, R.J. (2008) Structural proteomics of dengue virus. *Current opinion in microbiology* 11, 369-377.

86. Pijlman, G.P., Funk, A., Kondratieva, N., Leung, J., Torres, S., van der Aa, L., . . . Khromykh, A.A. (2008) A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell host & microbe* 4, 579-591.
87. Piper, R.C., Dikic, I., and Lukacs, G.L. (2014) Ubiquitin-dependent sorting in endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6.
88. Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L., and Strauss, J.H. (1985) Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229, 726-733.
89. Rico-Hesse, R., Harrison, L.M., Salas, R.A., Tovar, D., Nisalak, A., Ramos, C., . . . da Rosa, A.T. (1997) Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230, 244-251.
90. Rodenhuis-Zybert, I.A., van der Schaar, H.M., da Silva Voorham, J.M., van der Ende-Metselaar, H., Lei, H.Y., Wilschut, J., and Smit, J.M. (2010) Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS pathogens* 6, e1000718.
91. Rothbart, S.B. and Strahl, B.D. (2014) Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et biophysica acta* 1839, 627-643.
92. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2006) The inoue method for preparation and transformation of competent e. Coli: "ultra-competent" cells. *CSH protocols* 2006.
93. Samsa, M.M., Mondotte, J.A., Caramelo, J.J., and Gamarnik, A.V. (2012) Uncoupling cis-Acting RNA elements from coding sequences revealed a requirement of the N-terminal region of dengue virus capsid protein in virus particle formation. *Journal of virology* 86, 1046-1058.
94. Samsa, M.M., Mondotte, J.A., Iglesias, N.G., Assuncao-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A.T., . . . Gamarnik, A.V. (2009) Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS pathogens* 5, e1000632.
95. Sangiambut, S., Keelapang, P., Aaskov, J., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Malasit, P., and Sittisombut, N. (2008) Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection. *The Journal of general virology* 89, 1254-1264.
96. Scaturro, P., Cortese, M., Chatel-Chaix, L., Fischl, W., and Bartenschlager, R. (2015) Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS pathogens* 11, e1005277.
97. Scaturro, P., Trist, I.M., Paul, D., Kumar, A., Acosta, E.G., Byrd, C.M., . . . Bartenschlager, R. (2014) Characterization of the mode of action of a potent dengue virus capsid inhibitor. *Journal of virology* 88, 11540-11555.
98. Schalich, J., Allison, S.L., Stiasny, K., Mandl, C.W., Kunz, C., and Heinz, F.X. (1996) Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *Journal of virology* 70, 4549-4557.
99. Schlick, P., Taucher, C., Schittl, B., Tran, J.L., Kofler, R.M., Schueler, W., . . . Mandl, C.W. (2009) Helices alpha2 and alpha3 of West Nile virus capsid protein are dispensable for assembly of infectious virions. *Journal of virology* 83, 5581-5591.
100. Shih, C.M., Chen, C.M., Chen, S.Y., and Lee, Y.H. (1995) Modulation of the trans-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation. *Journal of virology* 69, 1160-1171.
101. Smith, T.J., Brandt, W.E., Swanson, J.L., McCown, J.M., and Buescher, E.L. (1970) Physical and biological properties of dengue-2 virus and associated antigens. *Journal of virology* 5, 524-532.
102. Stadler, K., Allison, S.L., Schalich, J., and Heinz, F.X. (1997) Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of virology* 71, 8475-8481.

103. Stiasny, K., Fritz, R., Pangerl, K., and Heinz, F.X. (2011) Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino acids* 41, 1159-1163.
104. Stocks, C.E. and Lobigs, M. (1998) Signal peptidase cleavage at the flavivirus C-prM junction: dependence on the viral NS2B-3 protease for efficient processing requires determinants in C, the signal peptide, and prM. *Journal of virology* 72, 2141-2149.
105. Su, W.C., Chen, Y.C., Tseng, C.H., Hsu, P.W., Tung, K.F., Jeng, K.S., and Lai, M.M. (2013) Pooled RNAi screen identifies ubiquitin ligase Itch as crucial for influenza A virus release from the endosome during virus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 17516-17521.
106. Tassaneeritthep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., . . . Marovich, M.A. (2003) DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 197, 823-829.
107. Teoh, P.G., Huang, Z.S., Pong, W.L., Chen, P.C., and Wu, H.N. (2014) Maintenance of dimer conformation by the dengue virus core protein alpha4-alpha4' helix pair is critical for nucleocapsid formation and virus production. *Journal of virology* 88, 7998-8015.
108. van der Schaar, H.M., Rust, M.J., Chen, C., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X., and Smit, J.M. (2008) Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS pathogens* 4, e1000244.
109. Vasilakis, N., Cardoso, J., Hanley, K.A., Holmes, E.C., and Weaver, S.C. (2011) Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature reviews. Microbiology* 9, 532-541.
110. Villordo, S.M., Alvarez, D.E., and Gamarnik, A.V. (2010) A balance between circular and linear forms of the dengue virus genome is crucial for viral replication. *RNA* 16, 2325-2335.
111. Villordo, S.M. and Gamarnik, A.V. (2009) Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus research* 139, 230-239.
112. Wang, S.H., Syu, W.J., Huang, K.J., Lei, H.Y., Yao, C.W., King, C.C., and Hu, S.T. (2002) Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. *The Journal of general virology* 83, 3093-3102.
113. Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K., Walther, P., . . . Bartenschlager, R. (2009) Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell host & microbe* 5, 365-375.
114. WHO (2009) *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. World Health Organization
115. Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L., and Polo, S. (2007) The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell division* 2, 11.
116. Wu, R.H., Tsai, M.H., Chao, D.Y., and Yueh, A. (2015) Scanning mutagenesis studies reveal a potential intramolecular interaction within the C-terminal half of dengue virus NS2A involved in viral RNA replication and virus assembly and secretion. *Journal of virology* 89, 4281-4295.
117. Xie, X., Gayen, S., Kang, C., Yuan, Z., and Shi, P.Y. (2013) Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *Journal of virology* 87, 4609-4622.
118. Xie, X., Zou, J., Puttikhunt, C., Yuan, Z., and Shi, P.Y. (2015) Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for dengue virus RNA synthesis and virion assembly. *Journal of virology* 89, 1298-1313.
119. Yon, C., Teramoto, T., Mueller, N., Phelan, J., Ganesh, V.K., Murthy, K.H., and Padmanabhan, R. (2005) Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 280, 27412-27419.

120. You, S. and Padmanabhan, R. (1999) A novel in vitro replication system for Dengue virus. Initiation of RNA synthesis at the 3'-end of exogenous viral RNA templates requires 5'- and 3'-terminal complementary sequence motifs of the viral RNA. *The Journal of biological chemistry* 274, 33714-33722.
121. Yu, I.M., Zhang, W., Holdaway, H.A., Li, L., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., . . . Chen, J. (2008) Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 319, 1834-1837.
122. Zhang, W., Chipman, P.R., Corver, J., Johnson, P.R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., . . . Kuhn, R.J. (2003a) Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature structural biology* 10, 907-912.
123. Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P.R., Zhang, W., Pletnev, S.V., Sedlak, D., . . . Rossmann, M.G. (2003b) Structures of immature flavivirus particles. *The EMBO journal* 22, 2604-2613.
124. Zhao, Y., Soh, T.S., Lim, S.P., Chung, K.Y., Swaminathan, K., Vasudevan, S.G., . . . Luo, D. (2015) Molecular basis for specific viral RNA recognition and 2'-O-ribose methylation by the dengue virus nonstructural protein 5 (NS5). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 14834-14839.
125. Zhou, H.L., Geng, C., Luo, G., and Lou, H. (2013) The p97-UBXD8 complex destabilizes mRNA by promoting release of ubiquitinated HuR from mRNP. *Genes & development* 27, 1046-1058.