

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Análisis de la participación de las proteínas S3a, L7
y Hsp70 en el ciclo replicativo de DENV2 y DENV4 en
células Huh-7”**

T E S I S

Que presenta

BIÓL. ARIANNA MAHELY HURTADO MONZÓN

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR

Directora de la tesis:
Dra. Rosa Ma. Del Ángel Núñez de Cáceres

México, D.F.

Agosto, 2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca **No. 342641** brindada para la realización de este proyecto, el cuál fue realizado en el laboratorio de Viología del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría de la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres y la asesoría de la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y el Dr. Juan Ernesto Ludert; todos ellos profesores investigadores del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.

ÍNDICE	Página
RESÚMEN-----	1
ABSTRACT-----	2
INTRODUCCIÓN-----	3
Patología-----	5
Ciclo Replicativo-----	7
Proteínas no estructurales-----	10
Proteínas ribosomales-----	13
Proteínas chaperonas-----	13
ANTECEDENTES-----	15
Proteínas ribosomales-----	17
Proteínas chaperonas-----	18
JUSTIFICACIÓN-----	20
HIPÓTESIS-----	21
OBJETIVOS-----	21
MATERIALES Y MÉTODOS-----	22
Propagación del virus-----	22
Cultivo celular y titulación celular-----	22
Citometría de flujo-----	23
Infección de células-----	23
Ensayo de western blot-----	23
Análisis densitométrico-----	24
Ensayo de inmunofluorescencia-----	24
Expresión de las proteínas NS1 y E recombinantes-----	25
Purificación y acoplamiento de las proteínas NS1 y E recombinantes a una columna de afinidad-----	26
Identificación de la proteína por análisis de western blot-----	26
Ensayo de overlay-----	27
RESULTADOS-----	28
Infección de células Huh-7 con DENV2 y DENV4-----	28
Proteínas ribosomales S3a y L7-----	29
Proteína de choque térmico Hsp70-----	37
Obtención de la proteína NS1 recombinante-----	40
Obtención de la proteína E recombinante-----	42
DISCUSIÓN-----	44
CONCLUSIONES-----	48

ÍNDICE	Página
PERSPECTIVAS-----	49
BIBLIOGRAFÍA-----	50

RESUMEN

El dengue se considera la enfermedad viral transmitida por mosquito vector más importante del mundo. Los virus son parásitos intracelulares obligatorios, que requieren que la célula huésped provea algunas de las moléculas necesarias para su reproducción. A pesar de los diversos estudios de interacciones realizados hasta la fecha, son pocas las proteínas que se ha podido demostrar su función dentro del ciclo replicativo del virus dengue. Recientemente, se han realizado varios estudios que han permitido conocer algunas de las proteínas de la célula huésped que interactúan con proteínas virales, como lo es con la proteína NS1 de DENV, cuya función en el ciclo viral aún no está bien descrita. En nuestro laboratorio, se encontró que NS1 de DENV interacciona con varias proteínas, entre las que se encuentran las proteínas ribosomales S3a y L7, así como la chaperona Hsp70. Se ha demostrado que éstas dos proteínas ribosomales tienen funciones extraribosomales y que Hsp70 tiene un papel importante en la regulación de la replicación del flavivirus VEJ, por tanto, es de nuestro interés conocer el papel de S3a, L7 y Hsp70 en el ciclo replicativo de DENV. Para ello, se analizó su expresión y localización durante la infección por DENV en células hepáticas Huh-7. No se observaron cambios en la cantidad de proteína S3a, L7 o Hsp70 en extractos de células Huh-7 infectadas con DENV2 o DENV4 comparados con extractos de células no infectadas, asimismo las proteínas S3a y L7 no cambiaron su distribución en las células Huh-7; mientras de Hsp70 parece redistribuirse hacia donde se encuentra la proteína viral NS3. Se corroborará la interacción entre NS1 y las proteínas S3a, L7 y Hsp70.

ABSTRACT

Dengue is considered the most important arthropod-borne human pathogen. Virus are intracellular obligatory parasites, which use some of the molecules of their host cell in order to complete their replication. Recently, extensive studies have reported some of the host cell proteins that interact with viral proteins, such as DENV NS1 protein, whose function in DENV life cycle has not been described yet. It was found in a previous study in our laboratory that DENV NS1 interacts with several proteins, including the ribosomal proteins S3a and L7, and the chaperone Hsp70. It has been shown that these two ribosomal proteins have extraribosomal functions and that Hsp70 has an important role in the regulation of JEV flavivirus replication. Therefore, our interest was to understand the role of S3a, L7 and Hsp70 in the replicative cycle of DENV. In order to assess this, S3a, L7 and Hsp70 expression and distribution was analyzed during the hepatic cell line Huh-7 DENV infection. No changes were found in the amount of S3a, L7 or Hsp70 protein in Huh-7 DENV2 or DENV4 infected protein extracts, compared to non-infected protein extracts. Also S3a and L7 proteins did not change their distribution in Huh-7 cells; while Hsp70 presented a redistribution to the sites where NS3 viral protein was observed. The interaction between NS1 viral protein and the host cell proteins S3a, L7 and Hsp70 will be corroborated.

INTRODUCCIÓN

Los flavivirus son un género de virus de RNA pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, el cual incluye al menos 73 virus distintos, varios de ellos patógenos humanos que son transmitidos por artrópodos. Dentro de este género se encuentra el virus de la encefalitis japonesa (VEJ), el virus del Oeste del Nilo (VON), el virus de la fiebre amarilla (VFA) y el virus dengue (DENV), entre otros (Kuhn, J. R 2011).

DENV es un arbovirus de gran importancia a nivel salud y a nivel socioeconómico, principalmente en países en desarrollo. Existen cuatro serotipos de DENV (DENV1-4), cualquiera de los cuales puede ser transmitido al hombre por la picadura de las hembras de mosquitos del género *Aedes*, principalmente los de la especie *A. aegypti*, aunque también pueden servir como vector los mosquitos de la especie *A. albopictus* (WHO 2013a).

El dengue se considera la enfermedad viral transmitida por mosquito más importante del mundo. El dengue afecta a 112 países y se estima que anualmente ocurren más de 50 millones de infecciones con 500 000 casos de fiebre hemorrágica por dengue y 22 000 muertes, principalmente en niños (WHO 2013b).

La fiebre por dengue (FD) y la fiebre hemorrágica por dengue (FHD) están presentes en áreas urbanas y suburbanas en el continente americano, en el Sureste de Asia, el Oeste del mediterráneo y en el Oeste del pacífico (Figura 1) (WHO 2013b). En el continente americano el dengue se considera la enfermedad re-emergente más importante y sus formas hemorrágicas son cada vez de mayor relevancia, especialmente debido al aumento progresivo en el número de defunciones (CENAPRECE 2013).



Figura 1. Áreas en riesgo de transmisión de dengue (Acheson N. H 2011).

En países en desarrollo en los trópicos y subtropicos, se han combinado distintos factores que producen condiciones epidemiológicas que favorecen la transmisión viral a través del principal mosquito vector; entre estos factores se encuentra, el rápido crecimiento poblacional, la migración rural-urbana, la infraestructura urbana básica inadecuada (suministro de agua poco fiable que lleva al almacenamiento de agua en contenedores cercanos a las casas) y un aumento en el volumen de desperdicios sólidos, como contenedores plásticos desechados y otros artículos abandonados que acumulan agua de lluvia y, por lo tanto, pueden servir de hábitats para las larvas en zonas urbanas. El aumento en el tráfico aéreo y el fracaso en las medidas de control del vector, han contribuido al aumento global del dengue y la FHD (WHO 2013b).

Los registros de la transmisión del dengue en México datan de 1941, cuando se notificaron 6 955 casos y una tasa de 34.4 por cada 100 000 habitantes; cifras que fueron descendiendo a medida que avanzaba la erradicación del vector, certificada hasta 1963. Sin embargo, el dengue reapareció a finales de los años setenta, en Tapachula y se diseminó por el territorio en menos de 10 años (Narro y Gómez 1995). Para 2012 se reportaron 32 662 casos de FD y 17 706 casos de FHD en la mayoría de los estados de la República

Mexicana, excepto en Aguascalientes, el Distrito Federal y Tlaxcala; siendo Morelos el estado con mayor incidencia, con 488.9 casos totales de dengue por 100 mil habitantes. En el país se encuentran en circulación los cuatro serotipos de DENV, siendo los más predominantes en 2012, los serotipos DENV1 y 2 (CENAVECE 2012).

PATOLOGÍA

DENV causa un amplio rango de enfermedades en humanos, desde la enfermedad aguda conocida como fiebre por dengue (FD), hasta la FHD y el síndrome de choque por dengue (SCD) que pueden llegar a ser mortales. El período de incubación varía de 3-14 días (en promedio de 4-7 días) (Gubler 1998; Rigau-Pérez et al. 1998).

La fiebre por dengue se presenta en tres fases, la fase febril, la fase crítica y la fase de recuperación. La fase febril se caracteriza por fiebre aguda por encima de 40°C y puede durar de 2 a 7 días. Los síntomas de esta fase son dolor en la parte frontal de la cabeza, dolor retroocular, dolor de músculos y de articulaciones, náusea, vómito y lesiones de tipo eritematosas (Mangold y Reynolds 2013; Gubler 1998; Rigau-Pérez et al. 1998).

La segunda fase de la FD, la fase crítica, tiene lugar entre los días 3 a 7 después del inicio de los síntomas. En esta fase, algunos pacientes mejoran, mientras que otros comienzan a desarrollar aumento en la permeabilidad capilar que los lleva a desarrollar FHD o SCD. Se puede presentar leucopenia durante el inicio de la fase febril, el hematocrito puede estar elevado y puede haber trombocitopenia durante la fase crítica (Mangold y Reynolds 2013). La última fase, puede prolongarse por semanas y puede estar asociada con debilidad y depresión, especialmente en adultos (Gubler 1998).

La FHD se define como una enfermedad febril con sangrado menor o mayor, trombocitopenia y salida de plasma. La FHD inicia con un aumento en la temperatura y otros síntomas que se asemejan a la FD, esta se desarrolla alrededor del día 3-7 de la enfermedad. El principal cambio patofisiológico

que determina la severidad de la FHD y que la diferencia de la FD es la salida de plasma. La extravasación ocurre a través de huecos en el endotelio, sin que se presente necrosis o inflamación del endotelio capilar. Las manifestaciones hemorrágicas comunes incluyen hemorragias en la piel, como petequia, lesiones purpúricas y hematomas (Gubler 1998; Rigau-Pérez et al. 1998).

El SCD se define como una FHD con signos de falla circulatoria, incluyendo hipotensión, o choque. Los cuatro signos de choque inminente son dolor abdominal intenso y sostenido, vomito persistente, letargia y un cambio repentino de fiebre a hipotermia con sudor y postración (Rigau-Pérez et al. 1998).

La infección por DENV produce un amplio espectro de síntomas, muchos de los cuales no son específicos de esta enfermedad. Por lo tanto, un diagnóstico basado únicamente en síntomas clínicos no es confiable (Buchy, P. et al. 2009). Una prueba de laboratorio que puede ser útil en el diagnóstico de FD es un conteo completo de células sanguíneas (que permita demostrar leucopenia, trombocitopenia y posibles anormalidades en el hematocrito). Existen pruebas más específicas como el cultivo celular, aunque este requiere hasta 2 semanas para obtener resultados, es cara y no es muy sensible, pero permite diagnosticar el serotipo de virus causante de la infección. El RT-PCR es rápido y sensible aunque también es costoso. El ensayo de ELISA es la prueba más utilizada, detecta IgM o IgG; los IgM son el primer isotipo en aparecer, estos son detectables en 50% de los pacientes en los días 3-5 de la enfermedad, aumentan a 80% para el día 5 y a 99% para el día 10. Mientras que los anticuerpos anti-dengue isotipo IgG en suero, son generalmente detectables a bajos títulos al final de la primera semana de la enfermedad, aumentando lentamente y siendo detectables después de varios meses (Buchy, P. et al. 2009; Mangold y Reynolds 2013).

En este momento, la prueba más empleada para el diagnóstico de dengue es la detección de la proteína NS1 en suero. Esta prueba resulta positiva desde el día uno o dos después del inicio de la fiebre. Además esta prueba

es altamente confiable y específica aunque la sensibilidad para los distintos serotipos no es la misma. Se ha reportado que la concentración de NS1 circulante es mayor en infecciones causadas por DENV1 que en las causadas por DENV2. Además, se sugiere que durante infecciones primarias, los niveles de NS1 circulante son mayores en pacientes con FHD que en pacientes con FD (de la Cruz-Hernández et al. 2013).

CICLO REPLICATIVO

Los virus son parásitos intracelulares obligatorios, que requieren que la célula huésped provea las moléculas necesarias para su replicación. Para replicarse, los virus deben transportar su genoma dentro de la célula huésped, en donde el genoma dirige la síntesis de las proteínas virales, es replicado y empaquetado para formar los nuevos viriones (Figura 2) (Acheson N. H 2011).

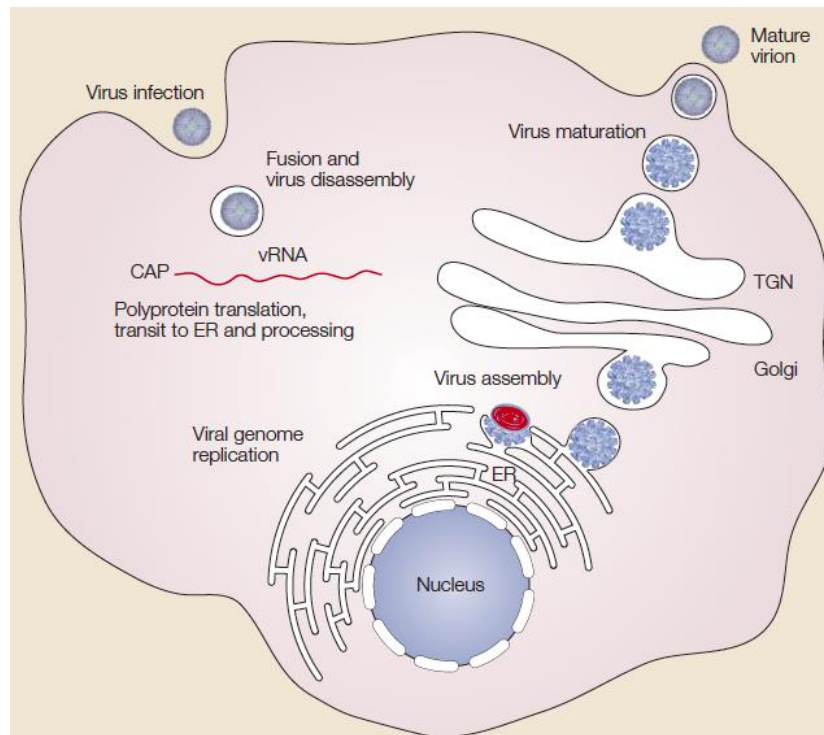


Figura 2. Ciclo replicativo de DENV. Los viriones se unen a la superficie de la célula huésped y entran por endocitosis mediada por receptor. En el endosoma acidificado se fusiona la membrana del virión a la membrana de esta vesícula y se libera el genoma al citoplasma. El virus se ensambla en la superficie del RE, las partículas virales inmaduras se transportan por la red del trans-Golgi, donde maduran gracias a la acción de la furina y se liberan por exocitosis (Mukhopadhyay, Kuhn, y Rossmann 2005).

El genoma de DENV consiste de una cadena de RNA positivo de ~11kb. Este RNA codifica para 3 proteínas estructurales (C, preM y E) que forman la partícula viral, y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5) involucradas en la replicación del RNA viral (Figura 3). Las partículas del DENV son icosaédricas de 50 nm de diámetro (Perera y Kuhn 2008).



Figura 3. Estructura del genoma de DENV. El RNA viral (RNAv) contiene una estructura cap tipo 1 en el extremo 5', y un único marco abierto de lectura, que codifica para las 10 proteínas virales, esta flanqueado por la 5' y 3' UTRs. La estructura secundaria presentada esta basada en DENV2 cepa del Sureste de Asia y es similar a otras cepas y serotipos. Las estructuras designadas como cHP, CS, UAR, DB1, DB2 y 3'SL fueron compiladas de una combinación de predicciones informáticas y análisis funcionales. RPdR, RNA Polimerasa dependiente de RNA; DB, "dumbbell" (pesa) (Clyde, Kyle, y Harris 2006).

Múltiples copias de la proteína C (11kDa) encapsidan el RNA para formar la nucleocápside viral. La nucleocápside esta rodeada de una bicapa lipídica derivada de la célula huésped, en la cual se encuentran ancladas 180 copias de M y E. La proteína M es un fragmento proteolítico pequeño (~ 8 kDa) de su forma precursora prM (~21 kDa). La proteína E (53 kDa) tiene tres dominios estructurales distintos. El dominio I esta posicionado entre el dominio II, que es el dominio de homodimerización, y el dominio III, de tipo inmunoglobulina (Rodenhuis-Zybert, Wilschut, y Smit 2010).

El virus entra a una célula huésped permisiva vía endocitosis mediada por receptor. La glicoproteína E es la que interacciona con el complejo receptor

a través de su dominio III. In vitro, DENV ha demostrado ser capaz de infectar diversas células humanas, incluyendo células dendríticas (DC), monocitos/macrófagos, células B, células T, células endoteliales, hepatocitos y células neuronales. El amplio rango de células permisivas a DENV indica que el virus debe unirse a una molécula de superficie celular ubicua o aprovechar múltiples receptores para entrar a la célula (Clyde, Kyle, y Harris 2006; Rodenhuis-Zybert, Wilschut, y Smit 2010). Algunos receptores que se han identificado en células de mamífero son el heparan sulfato, Hsp70 y 90, un receptor de alta afinidad de laminina de 37/67- kDa, así como la molécula de adhesión específica de DC (DC-SIGN) (Chen et al. 1997; Tassaneetrithep et al. 2003; Thepparit y Smith 2004; Reyes-Del Valle et al. 2005)

Para que la partícula viral entre a la célula, inicialmente es capturada por un receptor de baja afinidad ubicuo y, posteriormente un receptor de alta afinidad, que es menos común, lo que media la internalización del virión en endosomas de clatrina (Clyde, Kyle, y Harris 2006; Rodenhuis-Zybert, Wilschut, y Smit 2010). El ambiente ácido de los endosomas tardíos induce la disociación de los homodímeros de E, esto lleva a que se proyecte el dominio II de E y se exponga el péptido hidrofóbico de fusión que se inserta en la membrana del endosoma y de esta manera se forman trímeros de E. Posteriormente, el dominio III se dobla hacia el péptido de fusión en una conformación de tipo horquilla, lo que obliga a la membrana del endosoma y a la membrana viral a acercarse y, finalmente a fusionarse liberando la nucleocápside hacia el citoplasma celular (Fernandez-Garcia et al. 2009; Rodenhuis-Zybert, Wilschut, y Smit 2010).

Una vez que el genoma viral es liberado al citoplasma, el RNA de polaridad positiva se traduce en el retículo endoplásmico (RE) a una poliproteína que es procesada co- y post-traduccionalmente por las proteasas virales y de la célula hospedera para producir las proteínas virales, entre las que se encuentra la replicasa viral (NS5) (Mukhopadhyay, Kuhn, y Rossmann 2005). El genoma de este flavivirus funciona como un mRNA celular pues contiene un cap de tipo 1,7- metilguanosina en 5', una región no traducida (UTR) 5', un solo marco abierto de lectura y un 3' UTR; sin embargo, este

mRNA no está poliadenilado y se ha propuesto que su circularización, necesaria para la replicación viral, ocurre a través de interacción directa de los dominios 5' y 3' CS (Figura 3) (Clyde, Kyle, y Harris 2006; Paranjape, S. M y Harris, E 2010).

El mecanismo que usa DENV para competir por la maquinaria de traducción celular no es el apagado de la traducción de la célula huésped, sino la localización subcelular de procesos virales en estructuras membranales derivadas del RE, asegurando que la replicación, traducción y empaquetamiento sean orquestados eficientemente en focos aislados (Paranjape, S. M y Harris, E 2010). Las vesículas derivadas del RE son sitios de replicación del RNA viral y están conectadas con el citosol a través de un poro que, presumiblemente, sirve como sitio de salida de la progenie viral de RNA. El RNA se asocia con la proteína de la capsida formando un complejo que gema hacia el lumen del RE adquiriendo la membrana lipídica que tiene embebidos los heterodímeros de E y la proteína prM. Estas partículas inmaduras son transportadas a través de la vía de secreción celular y experimentan un paso de maduración, en el cual, la furina corta a prM en la red del trans-Golgi (Fischl y Bartenschlager 2011; Welsch et al. 2009). El producto de la ruptura de prM permanece asociado a la proteína E, previniendo la fusión prematura de la partícula durante la secreción, pr es liberado solamente después de que la partícula viral ha salido de la célula (Fischl y Bartenschlager 2011).

PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

De las proteínas virales no estructurales, las que se han caracterizado más extensivamente son NS3, su cofactor NS2B y NS5. La NS3 es una proteína multidominio, con un dominio proteasa N-terminal y una porción C-terminal que tiene las actividades de RNA trifosfatasa y RNA helicasa, involucradas en el capping y la síntesis de RNA viral, respectivamente. La actividad de proteasa de la NS3 depende de la presencia de su cofactor, NS2B que se encuentra conservado entre los flavivirus (Bollati et al. 2010; Clyde, Kyle, y Harris 2006; Perera y Kuhn 2008).

La proteína NS5, es la más larga de los flavivirus y la más conservada del género. Es una enzima bifuncional con un dominio metiltransferasa N-terminal y un dominio C-terminal de polimerasa de RNA dependiente de RNA. La actividad de metiltransferasa de esta proteína es esencial para el capping del RNA viral (Bollati et al. 2010; Clyde, Kyle, y Harris 2006).

Las proteínas menos caracterizadas son las proteínas hidrofóbicas NS2A, NS4A y NS4B. Estas están implicadas en la localización apropiada de proteínas virales y el RNA viral en los sitios de síntesis de RNA. NS4A participa en la inducción de la formación de invaginaciones de la membrana del RE. Se ha demostrado que NS4B y, en un menor grado, NS2A y NS4A son capaces de bloquear la transducción de señales mediada por interferón (IFN) (Clyde, Kyle, y Harris 2006; Miller et al. 2007).

Finalmente, la proteína NS1, tiene un peso molecular de 46-55 kDa, dependiendo de su estado de glicosilación y existe en múltiples formas oligoméricas en distintas localizaciones celulares: asociada a la membrana celular (mNS1), en compartimentos vesiculares dentro de la célula o en la superficie celular, y como una forma secretada de la célula (sNS1), siendo esta una proteína rica en lípidos (Muller y Young 2013). NS1 esta glicosilada en dos sitios, N130 y N207 y ambas glicosilaciones se requieren para la replicación viral en células de mosquito y para la neurovirulencia en ratones (Clyde, Kyle, y Harris 2006).

La sNS1 es uno de los principales antígenos responsables de la formación del complejo inmune, que es capaz de desencadenar procesos inflamatorios; y es un importante activador del complemento. Se ha demostrado que NS1 se une a distintos componentes de la vía del complemento, así como a otras proteínas regulatorias de la célula huésped. Entre estas proteínas se encuentra el factor de regulación del complemento H (fH), las proteínas del complemento C4b, hnRNP C1/C2 y STAT3 β (Muller y Young 2013; Avirutnan et al. 2011; Noisakran et al. 2008; Chua et al. 2005).

Se ha demostrado que en la infección con DENV, sNS1 activa al complemento directamente, mientras que la unión de anticuerpos específicos anti NS1 a la superficie de células infectadas dirige el ataque del complemento. La consecuente generación de complejos de ataque a la membrana (C5b-9) puede iniciar la activación celular y la producción de citocinas inflamatorias, que junto con los complejos de ataque a membrana solubles pueden contribuir a la patogénesis del dengue severo (Muller y Young 2013).

Por otro lado, la NS1 intracelular tiene un papel esencial como cofactor en la replicación viral y se ha demostrado que colocaliza con RNA de doble cadena (dsRNA) y otros componentes de los complejos de replicación. Sin embargo, la función precisa de esta proteína en la replicación viral aún se desconoce, se sugiere que puede tener una función estructural ayudando a anclar el complejo de replicación a la membrana. Una hipótesis razonable, es que esta función la lleva a cabo a través de la interacción con regiones de NS4A y/o NS4B que se encuentran en el lumen del RE (Figura 4) .

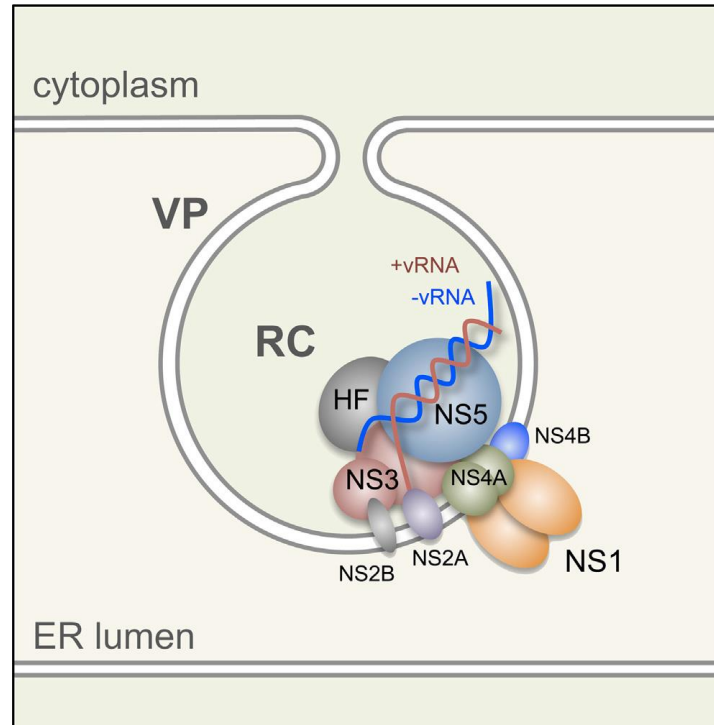


Figura 4. Esquema del complejo de replicación del virus dengue. NS1 se localiza en el lumen del RE, y su paso a través de la membrana de los paquetes vesiculares que contienen al complejo de replicación se cree que ocurre por interacciones con NS4B y NS4A (Muller y Young 2013).

PROTEÍNAS RIBOSOMALES

El ribosoma es un complejo grande compuesto de dos terceras partes de RNA y una tercera parte de proteínas. En el 2000 se logró determinar la conformación tridimensional de las subunidades mayor y menor, lo cual confirmó la evidencia previa de que el RNA ribosomal (RNAr) es el responsable de la estructura del ribosoma, de su habilidad para posicionar al RNA de transferencia (RNAt) en el RNA mensajero (RNAm) y su actividad catalítica que le permite formar los enlaces peptídicos. Los RNAr están plegados en estructuras tridimensionales muy compactas y precisas que forman el núcleo del ribosoma y determinan su forma. En contraste, las proteínas ribosomales se localizan generalmente en la superficie del ribosoma y llenan los huecos y hendiduras del RNA plegado. El papel principal de las proteínas ribosomales parece ser la estabilización del núcleo de RNA, así como permitir cambios necesarios en la conformación del RNAr, para que este catalice eficientemente la síntesis de proteínas. Además, probablemente, las proteínas ribosomales ayudan al inicio del ensamblaje del RNAr que forma el núcleo del ribosoma (Alberts, B et al. 2008).

Se han realizado análisis de las estructuras primarias de las proteínas ribosomales, lo que ha permitido formular algunas conclusiones fundamentales acerca de la diversidad, conservación y evolución de su estructura. Existe un grupo de proteínas ribosomales universales, constituido por 34 miembros, que se encuentran en todos los dominios de la vida (eucarya, archae y bacteria). Este grupo incluye 15 proteínas de la subunidad menor del ribosoma (S2-S5, S7-S15, S17 y S19) y 19 proteínas de la subunidad mayor del ribosoma (L1-L6, L10-L15, L18, L22-L24, L29, L30 y L7ae) (Korobeinikova, Garber, y Gongadze 2012).

PROTEÍNAS CHAPERONAS

Las chaperonas, también conocidas como proteínas de choque térmico, son un grupo de proteínas relacionadas funcionalmente, que incluyen miembros de las familias Hsp10, Hsp60 y Hsp70; las cuales asisten en el plegamiento de otras proteínas tanto en condiciones de estrés como en condiciones fisiológicas de la célula. Estas proteínas comparten la habilidad de reconocer

y unirse a proteínas no nativas, previniendo la agregación inespecífica. Una característica importante de las chaperonas es que involucran reacciones dependientes de energía en el proceso de plegamiento. La unión a nucleótidos dependiente de ATP, en las chaperonas (Hsp70, Hsp90, entre otras) a veces conduce a grandes cambios conformacionales en la proteína, que permiten alternar entre los estados de alta y baja afinidad por las proteínas sustrato. La actividad de ATPasa está fuertemente regulada por un grupo de co-chaperonas. Por otro lado, en el caso de las chaperonas independientes de ATP (Hsps, SecB) el paso dependiente de energía es realizado por otra chaperona (Hsp70, SecA). Por lo tanto, las chaperonas independientes de ATP pueden ser consideradas como eficientes componentes de unión. La cooperación de los diferentes mecanismos de las chaperonas crea una red sinérgica de plegado que permiten mantener la homeostasis de la proteína bajo condiciones no permisivas para el plegado espontáneo (Tavaria et al. 1996; Beissinger y Buchner 1998).

Las proteínas de la familia de las Hsp70 tienen funciones de mantenimiento de la célula, en las cuales son parte de los componentes de plegamiento de las proteínas y en las vías de transducción de señales; así como funciones de control de calidad, en las cuales se encargan de corregir la estructura de proteínas y de reparar componentes mal plegados (Mayer y Bukau 2005).

Estas proteínas tienen un dominio ATPasa N-terminal y un dominio de unión a sustrato C-terminal, el cual se divide en un subdominio de β plegada y uno de α hélice C-terminal. En los mamíferos existen dos isoformas de Hsp70 en el citoplasma, una forma de 73 kDa que se expresa constitutivamente (Hsc70) y una forma inducible por estrés, de 72 kDa (Hsp70) (Wegele, Müller, y Buchner 2004; Mayer y Bukau 2005).

ANTECEDENTES

Dada la austeridad que caracteriza a los virus, estos deben hacer uso de diversas proteínas y organelos de la célula huésped para completar su ciclo replicativo. Las moléculas necesarias para la replicación viral, participan en todos los pasos del ciclo, iniciando con los receptores, las moléculas de endosomas y tráfico vesicular necesarias para la internalización del virus, los ribosomas y los factores de traducción necesarios para la síntesis de proteínas virales, las proteasas celulares necesarias para el procesamiento de las proteínas virales, las chaperonas que darán la conformación adecuada a las proteínas virales, los lípidos que formarán las membranas del complejo de replicación, proteínas celulares necesarias para la replicación, moléculas necesarias para la glicosilación y chaperonas y moléculas de tráfico vesicular para la maduración y salida viral. Se han empleado diversas estrategias para identificar y caracterizar las proteínas del huésped que participan en la replicación viral. Así, a través de un ensayo de doble híbrido en levadura, se identificaron interacciones entre ocho proteínas de DENV2 y 105 proteínas de hígado humano, de ellas, 12 interaccionaron con la proteína viral NS1. Cuando silenciaron con RNA interferente 6 de las 105 proteínas identificadas se inhibió la replicación del replicón de DENV sugiriendo que estas proteínas del huésped eran importantes en el ciclo replicativo viral (Khadka et al. 2011).

En un estudio similar, de doble híbrido en levaduras, Le Breton et al. (2011) identificaron interacciones entre NS3 y NS5 de DENV2 y 108 proteínas humanas. Entre las proteínas identificadas encontraron una gran cantidad de proteínas involucradas en unión a RNA, regulación de la transcripción, transporte vesicular y regulación de la respuesta inmune innata.

Siguiendo la misma estrategia, Silva et al. (2013) encontraron 50 genes de hígado humano que interactúan con la proteína no estructural NS1 de DENV2; la mayoría de estos genes codifican para proteínas que son secretadas en el plasma de los pacientes. Asimismo confirman la interacción directa entre NS1 y la proteína del complemento C1q.

Finalmente, recientemente Mairiang et al. (2013) realizaron un escaneo de alto rendimiento, por ensayo de doble híbrido en levaduras, para identificar proteínas de mosquito y de humano que interaccionan físicamente con proteínas de los cuatro serotipos de DENV. Se encontraron 102 proteínas de mosquito y 46 de humano que interaccionaron con seis proteínas de DENV. No se encontraron proteínas que interaccionaran con E, NS1, NS2A ni NS2B, posiblemente porque estas proteínas no se localizan o pliegan correctamente en el núcleo de la levadura.

Usando una aproximación experimental distinta Colpitts et al. (2011) expresaron la proteína C madura de DENV en un ensayo de purificación de afinidad en tándem para identificar potenciales proteínas de unión en células de hígado humano (línea celular Huh-7). De esta manera, se encontraron como blancos de la proteína C a las histonas H2A, H2B, H3 y H4. La unión entre esta proteína y las histonas puede permitir que durante la infección viral se irrumpa la maquinaria genética normal de la célula huésped para favorecer la replicación viral y el ciclo replicativo del virus.

Otra de las estrategias utilizada ha sido la cromatografía de afinidad, a través de la cual Reyes-del Valle y del Angel (2004) usando como ligando a la proteína E recombinante marcada con Histidina en una cromatografía de metal, retuvieron a las glicoproteínas de 40 y 45 kDa, las cuales habían sido previamente reportadas en la superficie de las células C6/36 y que fueron reconocidas por DENV 4 en un ensayo de unión por superposición entre virus y proteínas.

Mientras que Upanan, Kuadkitkan, y Smith (2008) construyeron una columna de afinidad de sefarosa con DENV 2 para aislar proteínas de unión al virus, a partir de preparaciones de membrana de células HepG2. Por análisis de Western Blot de las fracciones eluidas de la columna detectaron una banda de aproximadamente 78 kDa con el anticuerpo anti-GRP78, confirmando, así que esta proteína es un receptor para DENV2.

Por último Cervantes-Salazar, M. (2011) por medio de cromatografía de afinidad de cobalto acoplada a proteínas recombinantes, aisló proteínas celulares que se unieron a NS1 y a NS5, las cuales fueron identificadas por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS/MS). Dentro de las proteínas identificadas que interaccionan con la proteína NS5 recombinante, se encontró a la S-adenosilmetionina-sintetasa, la cual genera el metilo que debe usar NS5 para metilar al RNA viral. Mientras que en el caso de NS1 recombinante, se encontraron proteínas ribosomales principalmente.

Proteínas ribosomales

Las proteínas ribosomales han permanecido altamente conservadas durante la evolución, lo que presumiblemente refleja que tienen funciones críticas en la biogénesis del ribosoma o en la función del ribosoma maduro. Sin embargo, distintos grupos de investigación han mostrado que una gran cantidad de proteínas ribosomales poseen funciones adicionales extra-ribosomales en apoptosis celular, transcripción/traducción, procesamiento de RNAm, reparación del DNA, desarrollo y tumorigénesis. La existencia de estas funciones ribosomales, puede deberse a que las proteínas ribosomales suelen tener motivos como los dedos de zinc que les permiten unirse a RNA y a DNA (Lindström 2009). Entre estas proteínas se encuentra la L7 y la S3a. En el caso de la primera Neumann et al. (1995) mostraron que la proteína L7 inhibe específicamente la traducción libre de un RNAm reportero de luciferasa, para esta inhibición se requiere de la interacción entre L7 dimérica y el RNAm. La interacción entre la proteína y el RNAm es inhibida por anticuerpos dirigidos contra la región de tipo básica de cierre de leucinas (BZIP) de L7 y por competidores que se unen al RNAm. En células de linfoma T de Jurkat transfectadas con cDNA de L7, se reporta la interferencia en la síntesis de dos proteínas asociadas a núcleo. Este estudio sugiere que L7 participa en la regulación del aparato de traducción eucariótico.

Siguiendo con esta línea de investigación Neumann y Krawinkel (1997) transfectaron establemente células de linfoma T de Jurkat con cDNA de L7 y observaron que la expresión constitutiva de esta proteína lleva a un arresto

en el ciclo celular en la fase de G1 e induce apoptosis a consecuencia del contacto célula-célula. Estos resultados sugieren que L7 interfiere con la traducción de proteínas que controlan la progresión del ciclo celular y/o el inicio de la vía apoptótica y que pertenece al grupo de las proteínas ribosomales con funciones extra-ribosomales.

Kashuba et al (Kashuba et al. 2005) encontraron, a través de un sistema de doble híbrido, que la proteína RPS3a se une a la proteína EBNA-5 (antígeno nuclear codificado en virus de Epstein-Barr), una de las primeras proteínas que se expresa en células B infectadas con el virus de Epstein-Barr. En células transfectadas con S3a y EBNA-5 mostraron altos niveles de colocalización en inclusiones extranucleolares. Este estudio sugiere que la unión de EBNA-5 con S3a puede influir en las funciones de S3a de promoción del crecimiento, inhibición de la diferenciación o apoptosis.

Respecto a S3a, Lim et al. (2011) exploraron el efecto de su sobreexpresión en la señal de NF- κ B inducida por la proteína X del virus de la hepatitis B (HBx). De esta manera encontraron un aumento en la inducción de la señal de NF- κ B por HBx, lo cual fue investigado por la habilidad de NF- κ B de trasladarse al núcleo y un análisis de silenciamiento de RPS3a. Los resultados sugieren que RPS3a, a través de una función extra-ribosomal de chaperona de HBx, contribuye a la oncogénesis inducida por el virus.

Proteínas chaperonas

En los mamíferos, las chaperonas Hsp70 y Hsp90 están involucradas en el plegamiento y maduración de proteínas reguladoras clave, como receptores nucleares (receptores de hormonas esteroideas), factores de transcripción (HSF, c-Myc) y cinasas (Raf, eIF2 α -cinasa, CiclinaB1/CDK1) (Wegele, Müller, y Buchner 2004; Mayer y Bukau 2005).

A través de la interacción con distintas proteínas, las chaperonas Hsp70 están involucradas en transducción de señales, regulación del ciclo celular, diferenciación y muerte celular programada. Por lo tanto, no es sorprendente

que también sean factores importantes en el desarrollo de procesos patológicos como oncogénesis, enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, envejecimiento e infecciones virales (Mayer y Bukau 2005). Recientemente, se ha acumulado evidencia de diversos estudios que indican que Hsp70 es una proteína de la célula huésped importante en la regulación de varios aspectos del ciclo replicativo viral, como la entrada a la célula, replicación del genoma, expresión del genoma viral, plegamiento de proteínas virales, ensamble del virión e incluso transformación celular inducida por virus. En cuanto a los estudios realizados en flavivirus, (Reyes-Del Valle et al. 2005) identificaron a Hsp70 como parte del complejo receptor de DENV en monocitos/macrófagos y en una línea celular de neuroblastoma, usando a la proteína E recombinante como ligando en cromatografía de afinidad y realizando ensayos de inhibición.

Por otro lado (Ye et al. 2013) realizaron un estudio con otro miembro de la familia de los flavivirus, el VEJ, en el cual, por medio de purificación de afinidad en tándem (TAP por sus siglas en inglés Tandem Affinity Purification) seguido de análisis por espectrometría de masas identificaron a eEF1- α , Ran (proteína nuclear relacionada con Ras) y a Hsp70 como proteínas que interaccionan con NS5. Asimismo se sugiere que Hsp70 tiene un papel importante en la regulación de la replicación del VEJ, ya que observaron que esta proteína colocaliza parcialmente en el citoplasma con componentes del complejo de replicación viral, incluyendo NS3, NS5 y RNAdc durante infección con este virus; y que la reducción de la expresión de Hsp70 resulta en una disminución de la replicación del genoma del VEJ.

JUSTIFICACIÓN

Los virus dependen de factores celulares para completar su ciclo de replicación. Por lo tanto, interaccionan con proteínas celulares para adquirir actividades que no están codificadas en su genoma, para manipular vías celulares y poder crear un ambiente favorable para su replicación. Sin embargo, a pesar de los diversos estudios de interacciones realizados hasta la fecha, son pocas las proteínas en las que se ha podido demostrar su función dentro del ciclo replicativo viral.

Recientemente, se han realizado estudios que han permitido conocer algunas de las proteínas de la célula huésped que interactúan con proteínas virales, tal es el caso de NS1 de DENV, cuya función en el ciclo viral aún no está bien descrita. En nuestro laboratorio, se encontró que NS1 de DENV interacciona con varias proteínas, entre las que se encuentran las proteínas ribosomales S3a y L7 y la chaperona Hsp70, entre otras. Se ha demostrado que éstas proteínas ribosomales tienen funciones extraribosomales y que Hsp70 tiene un papel importante en la regulación de la replicación del flavivirus VEJ, por tanto, es de nuestro interés conocer el papel de S3a, L7 y Hsp70 en el ciclo replicativo de DENV.

HIPÓTESIS

Las proteínas ribosomales S3a y L7, así como la chaperona Hsp70, participan en el ciclo replicativo de DENV en células hepáticas Huh-7.

OBJETIVO

Analizar la participación de las proteínas ribosomales S3a y L7 y de la chaperona Hsp70 en el ciclo replicativo de DENV2 y DENV 4 en células Huh-7.

Objetivos particulares

- Analizar la expresión de S3a, L7 y Hsp70 durante la infección de células Huh-7 con DENV2 y DENV4.
- Analizar la distribución subcelular de S3a, L7 y Hsp70 durante la infección de células Huh-7 con DENV2 y DENV4.
- Confirmar la interacción entre NS1 y las proteínas S3a, L7 y Hsp70 durante la infección de células Huh-7 con DENV2 y DENV4.

MATERIALES Y MÉTODOS

Propagación del virus

La propagación del DENV2 cepa Nueva Guinea y el DENV4 cepa 4H241, se realizó en cerebros de ratones neonatos CD1 (2 a 3 días de nacidos), los cuales se inocularon por vía intracraneal. A los 4 o 5 días postinfección, el cerebro de ratón fue extraído por succión, homogeneizado y clarificado por centrifugación, para ser finalmente filtrado en membrana de 0.22 μm . El virus presente en el lisado de cerebro fue titulado por ensayos de plaqueo.

Cultivo celular y titulación viral

Las células Huh-7 (línea celular derivada de un hepatocarcinoma) fueron cultivadas en Dulbecco medio esencial mínimo (DMEM) suplementado con 2mM de glutamina, penicilina (5×10^4 U/mL), estreptomycin (50 μg /mL), suero fetal bovino 5%, 1mL/L de amfotericina B (fungizona) a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂. Las células BHK-21 (de riñón de hámster recién nacido), que se usaron para los ensayos de plaqueo, se crecieron en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con aminoácidos no esenciales, suero fetal bovino 10%, penicilina y estreptomycin.

El título viral se determinó por ensayo de plaqueo en monocapas confluentes de células BHK-21 cultivadas en placas de 24 pozos. Las células BHK-21 a un 80 a 90% de confluencia, fueron inoculadas con diluciones en serie en base diez de homogenizados de cerebro de ratón CD1. Después de 1h de adsorción viral, la monocapa se cubrió con 1 mL de MEM con 3% de carboximetil-celulosa, 0.5% de suero fetal bovino y 2 mM/L de glutamina. Los cultivos se incubaron a 37°C por cinco días y posteriormente se contó la formación de placas después de fijar las células con paraformaldehído 4% y teñirlas con cristal violeta al 0.1%.

Para la inactivación de DENV con luz UV, las preparaciones virales cuyo título viral ya se conocía, se colocaron en hielo y se inactivaron con una lámpara de luz UV por 3h agregándole psoralen 1mM. Posteriormente, se volvió a realizar ensayo de plaqueo para corroborar la inactivación del virus.

Citometría de flujo

Para determinar el porcentaje de infección de las células Huh-7 con DENV2 y DENV4, estas fueron infectadas con ambos serotipos a una MOI de 1 y a una MOI de 3, permitiendo la infección por 48 horas. Posteriormente, las células se despegaron, se fijaron con paraformaldehído 2%, se lavaron con PBS tres veces, para ser bloqueadas y permeabilizadas con solución bloqueadora y permeabilizadora (PBS 1X, saponina 0.2% y suero fetal bovino 1%), se colocó anticuerpo primario anti E 1:100 hecho en ratón, se realizaron dos lavados con la solución permeabilizadora y bloqueadora y se colocó el anticuerpo secundario Alexa 488 anti-ratón 1:200. Finalmente, se lavaron con PBS para ser leídas en el citómetro de flujo BD LSRFortessa.

Infección de células

Las células Huh-7 a una confluencia de 70-80%, se infectaron con DENV2 o DENV4 a una multiplicidad de infección (MOI) de 3. El virus se dejó adsorber por una hora a 37°C. Después de este tiempo, las células se trataron con glicina ácida (pH 3) por un minuto, para inactivar al virus que no hubiera entrado a las células. A continuación, se hicieron tres lavados con medio Hanks y después se adicionó medio fresco DMEM suplementado con suero, permitiendo la infección por 6, 24 y 48 horas.

Ensayo de Western blot

Para analizar la cantidad de las proteínas S3a, L7 y Hsp70 en las células no infectadas e infectadas, se sembraron 3.5×10^5 células Huh-7 en una placa de 6 pozos. En el momento en que alcanzó una confluencia de 60-80% se realizó la infección con DENV2 o DENV4 a una MOI de 3 como fue previamente descrito. Como controles se usaron células Mock (incubadas con lisado de cerebro de ratones CD1 neonatos sin inocular con DENV) o con virus inactivado. La infección se permitió por distintos tiempos postinfección desde 0 hasta 48 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X y posteriormente lisadas con buffer de lisis (Tris 50mM pH 8, NaCl 300 mM, Glicerol 10% y Tritón X-100) en presencia de inhibidor de proteasas COMPLETE (Santa Cruz

Biotechnology). Los lisados se clarificaron por centrifugación (10, 000 rpm) y se analizaron 40 µg de proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sódico (SDS-PAGE). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (0.22 µm) mediante una cámara de transferencia húmeda. La membrana fue bloqueada con leche al 10% y se incubó toda la noche con el anticuerpo primario. Para S3a se usó un anticuerpo policlonal hecho en conejo (Abcam) a una dilución 1:10000; para L7 se usó un anticuerpo policlonal hecho en conejo (Abcam) a una dilución 1:12000 y para Hsp70 se usó un anticuerpo monoclonal hecho en ratón (Abcam) a una dilución 1:7500. Como control de carga se usó un anticuerpo anti-GAPDH hecho en conejo (Abcam) a una dilución 1:10000. Posteriormente a la incubación con el anticuerpo primario, se lavó la membrana con PBS 1X y se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa anti-conejo y anti-ratón, ambos a una dilución 1:10000 por 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce).

Análisis densitométrico

El análisis densitométrico de las bandas obtenidas en los ensayos de Western-blot se realizó con la ayuda del software ImageJ, el cual genera un histograma en base a la intensidad de la banda. En este histograma, se mide el área bajo la curva, la cuál permite calcular el porcentaje de expresión de la proteína problema con respecto al control de carga.

Ensayo de inmunofluorescencia

Las células Huh-7 se sembraron sobre cubreobjetos redondos y se infectaron con DENV2 o DENV4 o bien se trataron como Mock durante 48 horas. Una vez transcurrido ese tiempo se lavaron tres veces con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 1% (PFA) por 20 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon y permeabilizaron con buffer de bloqueo (PBS, suero fetal bovino 1%, saponina 0.2%) por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios en buffer de bloqueo durante toda la noche a 4°C, las diluciones usadas fueron

para S3a 1:50, para L7 1:75 y para Hsp70 1:75, asimismo como control de infección se marcó a las proteína viral E usando el anticuerpo 4G2 hecho en ratón a una dilución 1:75 y NS3 a una dilución 1:200. A continuación, se lavaron las laminillas y se incubaron por una hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios Alexa 555 anti-conejo y Alexa 488 anti-ratón. Se lavaron las laminillas y el núcleo se tiñó con DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) por 20 minutos a temperatura ambiente para, finalmente, montar las laminillas en portaobjetos usando 3 μ l de vecta shield. Las imágenes se analizaron en microscopio confocal.

Expresión de las proteínas NS1 y E recombinantes.

Para poder expresar la proteína NS1 y E recombinantes, se transformaron bacterias competentes BL-21 por choque térmico con el plásmido recombinante p-ProEx-NS1 y el plásmido pJR-Er. Para ello, se tomaron 30 μ l de bacterias competentes y se les adicionó 1 μ l del plásmido correspondiente a una concentración de 175 ng/ μ l y se dejaron 15 min en hielo. Posteriormente, se dió el choque térmico a 42°C por 30 seg y se pasó el tubo de nuevo a hielo por 3 min. A continuación, se le adicionaron 600 μ l de medio LB (Luria Broth) y se dejó 1 hora en agitación constante a 37°C. Después se recuperaron las bacterias transformadas, centrifugando a 2000 rpm por 5 min, estas bacterias recuperadas se espatularon en una caja de agar con medio LB-ampicilina (100mg/ml) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se tomó una colonia bacteriana para ser cultivada en 10 ml de medio LB-ampicilina (100mg/ml) a 37°C por 24 horas en agitación constante. Pasado este tiempo, se recuperaron las bacterias de los 10 ml de medio LB-ampicilina (100mg/ml) y se cultivaron en 1 litro de medio LB-ampicilina (100mg/ml) con 30 ml de glucosa 1M a 37°C hasta que el crecimiento alcanzó una densidad óptica (OD) de 0.60-0.80. Cuando la OD se alcanzó, las bacterias fueron recuperadas por centrifugación a 8500 rpm por 25 min a 4°C y la pastilla se resuspendió y se puso en medio LB para realizar la inducción de la proteína recombinante con IPTG 1mM (Isopropil- β -tio-galactósido) por 20 horas a 37°C en agitación suave y constante para NS1 recombinante. En el caso de la proteína E

recombinante, la inducción se realizó en medio LB con IPTG 1mM a 32°C. Una vez finalizada la inducción de la proteína recombinante, las bacterias se recuperaron por centrifugación a 8500 rpm a 4°C por 25 min y la pastilla fue congelada a -20°C hasta su uso. La pastilla bacteriana se descongeló a temperatura ambiente (TA) para adicionarle 5 ml de buffer de lisis bacteriana (50mM de Tris pH 8.0, 300 mM de NaCl, glicerol al 10% y tritón X-100 al 0.1%) acompañado de una pizca de lisozima y 500 µl de cocktail inhibidor de proteasas libre de EGTA, DTT y EDTA. La mezcla se dejó reposar por 60 min en hielo para después sonicar 10 seg en on/10 seg en off por 3 min. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 6000 rpm a 4°C por 45 min. El sobrenadante se recuperó para ser guardado a 4°C con 500 µl de cocktail inhibidor de proteasas y la pastilla se guardó a -20°C.

Purificación y acoplamiento de las proteínas NS1 y E recombinantes a una columna de afinidad.

El sobrenadante bacteriano que se obtuvo por sonicación de las bacterias se puso a interactuar con 500 µl de la resina TALON (resina de afinidad a metal) previamente lavada 5 veces con agua destilada estéril y equilibrada con buffer de lisis bacteriana toda la noche a 4°C en agitación suave y constante. La resina se recuperó por centrifugación a 1500 rpm durante 2 min a 4°C y se colocó en una columna, la cual se lavó 5 veces con buffer A (50mM de Tris pH 8.0, 500mM de NaCl, Tritón X-100 0.1%, glicerol 10% y etanol 10%) y 5 veces con buffer A e imidazol a las siguientes concentraciones: 100, 150, 250, 300 y 350 mM. Una vez eliminadas todas las proteínas de origen bacteriano que interactuaban con la proteína recombinante, se tomó la resina y se corrió en un gel SDS-PAGE al 10% para ser teñido con azul brillante de Coomassie, donde se observó la pureza de la proteína. La presencia de la misma, también fue confirmada por análisis de Western Blot.

Identificación de la proteína por análisis de Western Blot

Para verificar la presencia de las proteínas NS1 y E recombinantes, se tomaron 30 µl del sobrenadante de las bacterias en las que se indujo la

proteína y se le adicionaron 6 μ l de buffer de muestra 5X (Tris pH 6.8 2.5%, SDS 40%, glicerol 20%, β -mercapto 10% y azul de bromofenol 5%) a la resina, este sobrenadante se corrió en un gel SDS-PAGE al 10%. Al termino de la electroforesis se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa mediante una cámara de transferencia húmeda, la membrana fue bloqueada con leche sin grasa al 10% disuelta en PBS-Triton X-100 0.5%, posteriormente, se colocó el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. El anticuerpo anti-His se usó a una dilución 1:500 y como anticuerpo secundario se usó un anti-conejo acoplado a HRP a una dilución 1:10000. La reacción se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce).

Ensayo de overlay

Una vez confirmada la presencia de las proteínas NS1 y E recombinantes, la resina fue lavada dos veces con buffer A e imidazol 400 mM y dos veces con buffer A e imidazol 500 mM. Se tomaron 30 μ l de la resina y se le adicionaron 6 μ l de buffer de muestra 5X, se hirvió por 10 min y se centrifugó para correr el sobrenadante en un gel SDS-PAGE al 10%. Al termino de la electroforesis se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa mediante una cámara de transferencia húmeda y la membrana fue bloqueada con leche sin grasa al 10% disuelta en PBS-Triton X-100 0.5%. La membrana se puso a interaccionar con extracto proteico de células Huh-7 a una concentración de 1mg/ml durante toda la noche a 4°C, posteriormente, se lavó cinco veces con PBS y se incubó con el anticuerpo primario S3a (1:10000), L7 (1:12500) o Hsp70 (7500) toda la noche a 4°C, le lavó y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a HRP respectivo durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce).

RESULTADOS

Infección de células Huh-7 con DENV2 y DENV4

El primer paso para evaluar la expresión y localización subcelular de las proteínas S3a, L7 y Hsp70 en células Huh-7 fue obtener el título viral de DENV2 y DENV4 previamente propagados en ratones CD1 neonatos. Para ello, se realizaron ensayos de plaqueo en células BHK-21. El título viral obtenido fue de 2.5×10^7 UFP/ml para DENV2 y de 5×10^6 UFP/ml para DENV4 (Figura 5). Una vez que teníamos el título viral los dos serotipos, se comprobó que estos virus fueran infectivos, midiendo el porcentaje de células Huh-7 infectadas a las 48h a MOI de 1 y MOI de 3 por medio de citometría de flujo (Figura 6). Como puede observarse, a la MOI de 1 se obtuvo alrededor de un 30% de infección para ambos serotipos. Este porcentaje se incrementó hasta el 58 y 50 % para DENV2 y DENV4 a una MOI de 3 respectivamente. Dado que a la MOI de 3 se observó la mayor cantidad de células infectadas, se usó esta cantidad de virus para realizar los ensayos posteriores.

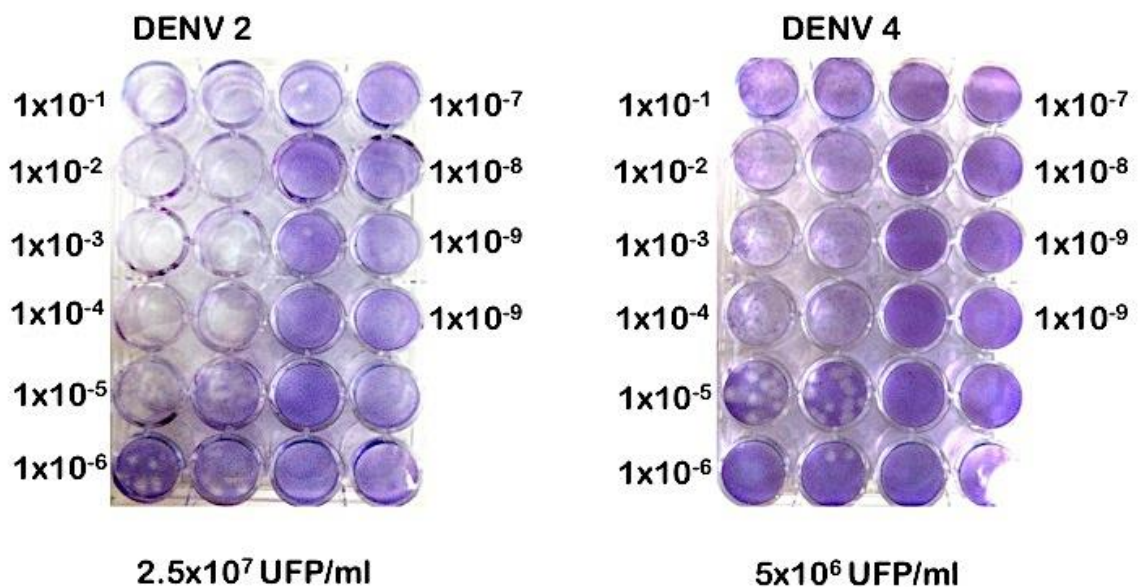


Figura 5. Título viral de DENV2 y DENV4 en células BHK21. Las células BHK21 fueron inoculadas con diluciones en serie en base diez de DENV2 a la izquierda o DENV4 a la derecha. Se observa la formación de placas después de cinco días de incubación de las células a 37°C en MEM con 3% de carboximetil-celulosa, 0.5% de suero fetal bovino y 2 mM/L de glutamina. El título viral en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml) de cada serotipo se presenta en la parte inferior.

Una vez que establecimos la MOI a la cual se trabajaría, se realizó una cinética de infección en células Huh-7, inoculando DENV2 o DENV4 a MOI 3 durante una hora a 37°C para posteriormente inactivar al virus que no hubiera entrado durante este tiempo, por medio de glicina pH3. A continuación, las células se lavaron con medio Hanks y se adicionó medio fresco DMEM suplementado con suero. A cada tiempo, desde 6 y hasta 48 hpi se evaluó la presencia y cantidad de las proteínas S3a, L7 y Hsp70 mediante ensayos de Western-blot y, por otro lado, mediante inmunofluorescencia a las 48 hpi se evaluó la localización subcelular de estas proteínas.

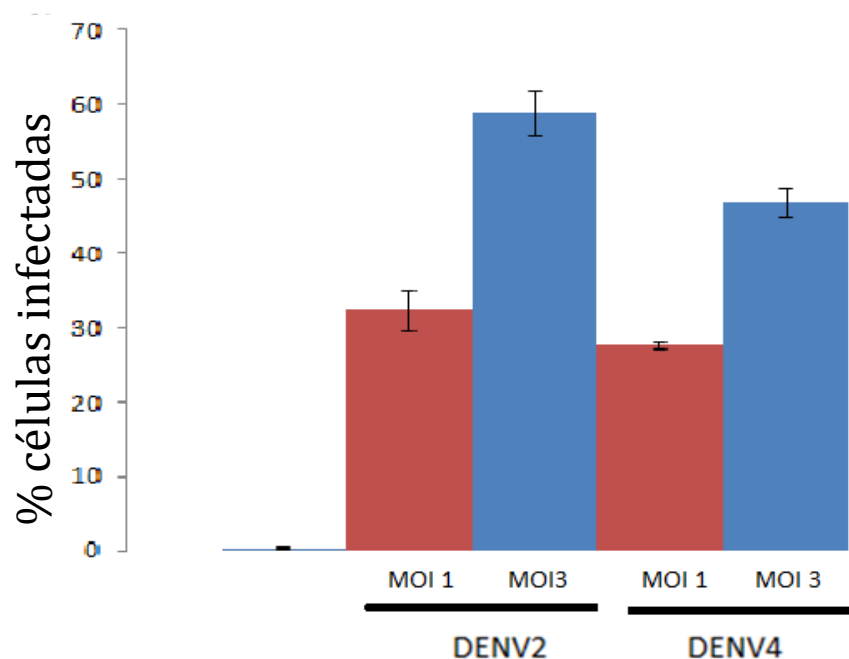


Figura 6. Porcentaje de células Huh-7 infectadas con DENV2 o DENV4. Las células Huh-7 fueron infectadas con DENV2 o DENV4 a MOI 1 o MOI 3 por 48 hrs. La cantidad de células infectadas se determinó mediante citometría de flujo usando un anticuerpo anti-E 4G2 hecho en ratón y como anticuerpo secundario a Alexa 488 anti-ratón. La gráfica muestra los resultados de tres experimentos independientes realizados por duplicados.

Proteínas ribosomales S3a y L7

Para determinar si había cambios en la cantidad de proteína S3a y L7 debidos a la infección con DENV2 o DENV4, se realizaron ensayos de Western-blot con los extractos protéicos de células Huh-7 no infectadas

(Mock) o infectadas, con virus activo o con virus inactivado por diferentes tiempos de 6 a 48 horas. Las proteínas aisladas de cada condición se separaron en geles SDS-PAGE al 10%, los cuales fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa que fue incubada con los anticuerpos primarios anti-S3a o anti-L7. Como control de carga se utilizó el anticuerpo anti-GAPDH. Mediante análisis densitométrico, usando como control a GAPDH, encontramos que a los distintos tiempos post-infección tanto con DENV2 como con DENV4 no hay una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de proteína S3a (Figura 7 y 8) ni en la proteína L7 (Figura 10 y 11) presente en los extractos de células Huh-7, así mismo, no hay diferencia en la cantidad de estas proteínas cuando se comparan las células infectadas con las Mock o con las incubadas con virus inactivado.

Debido a que no se observó un cambio en la cantidad de proteína a los distintos tiempos post-infección, se decidió evaluar la distribución subcelular de S3a y de L7 para determinar si la infección con DENV2 o DENV4 traía consigo un cambio en la localización de estas proteínas. Para esto, las células Huh-7 no infectadas (Mock) o infectadas con DENV2 o con DENV4 por 48 horas, se permeabilizaron y se bloquearon para incubarlas con anticuerpo primario anti-S3a (conejo 1:75) o anti-L7 (conejo 1:100) y anti-E (ratón 1:75) y los núcleos se tiñeron con DAPI.

En la figura 9 se observa que la proteína S3a, marcada en rojo, se localiza en el citoplasma de las células Huh-7 no infectadas. Esta localización no se modifica en las células infectadas con DENV2 o DENV4, sugiriendo que la infección con DENV no induce cambios en la localización de S3a.

Asimismo la proteína L7, marcada en rojo, presentó la misma localización en las células Mock que en las células infectadas DENV2 o DENV4, haciendo evidente que la infección no modificó la localización de L7 (Figura 12).

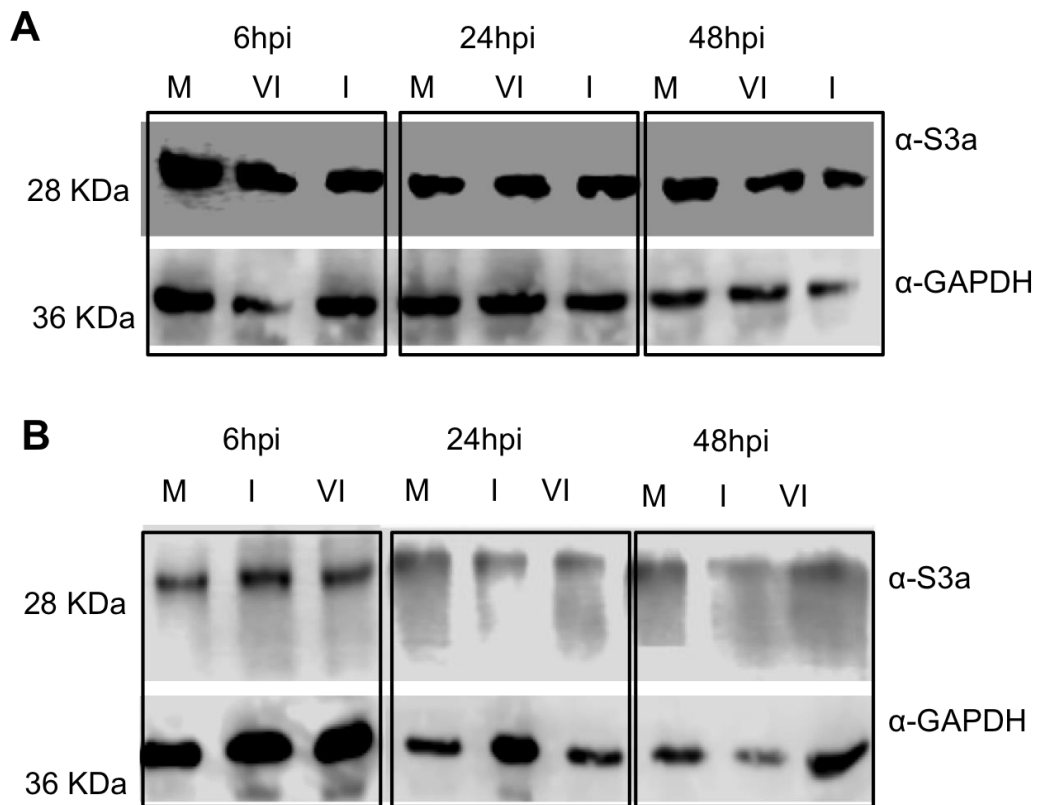


Figura 7. Evaluación de la cantidad de proteína ribosomal S3a a diferentes tiempos post-infección. Las células Huh-7 no infectadas (M), o infectadas con DENV2 (A) o con DENV4 (B) activo (I) o inactivado (VI) por diferentes tiempos se usaron para purificar las proteínas totales las cuales se separaron en SDS-PAGE y se sometieron a Western-blot con anticuerpo anti-S3a y GAPDH. El peso molecular de cada una de las proteínas se indica del lado izquierdo de la figura, mientras que del lado derecho se indica el nombre de la proteína detectada por el anticuerpo.

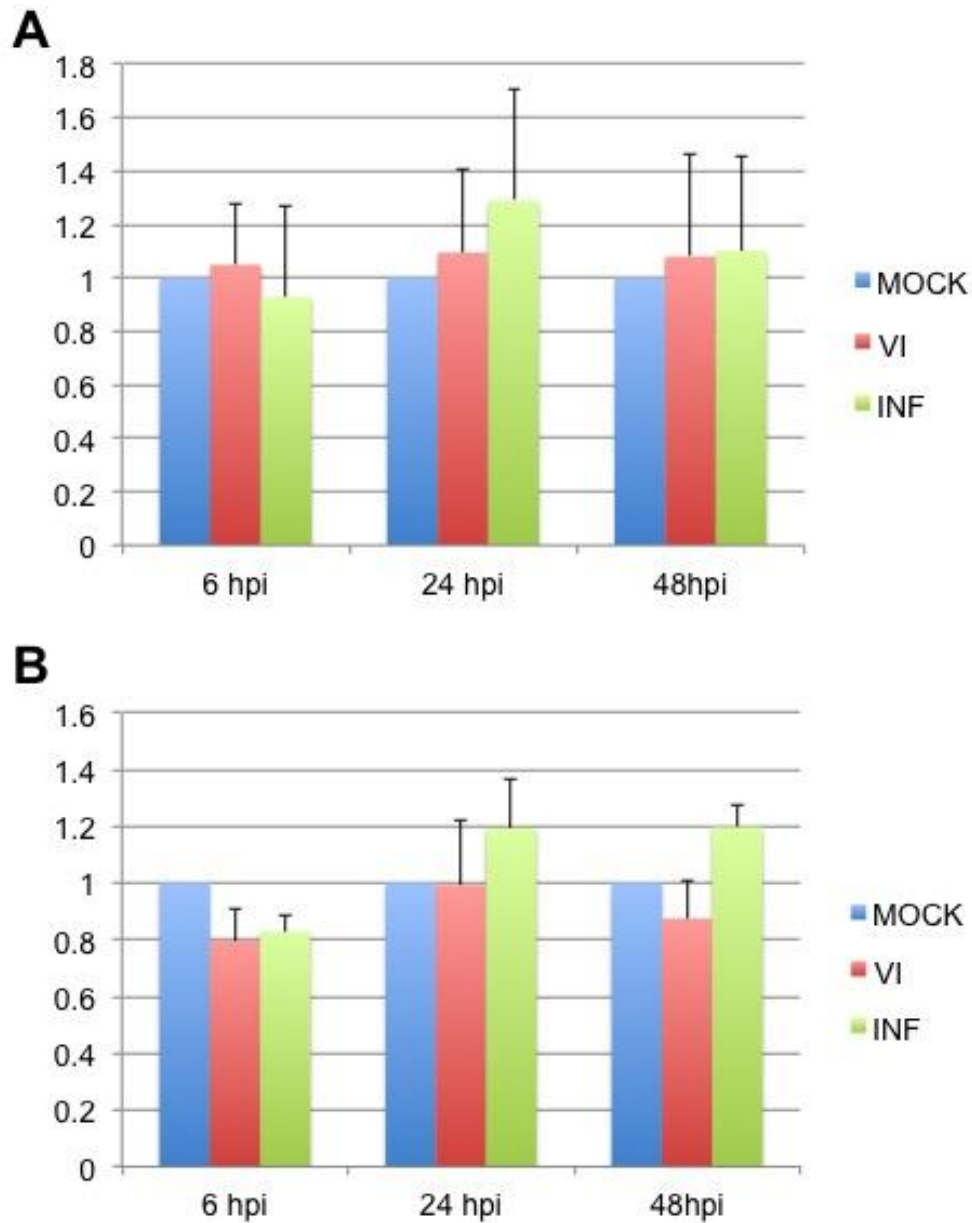


Figura 8. Análisis densitométrico de la cantidad de proteína ribosomal S3a a diferentes tiempos post-infección. Se realizó el análisis densitométrico de la proteína S3a de las células Huh-7 no infectadas (Mock) o infectadas con DENV2 (A) o con DENV4 (B) activo (I) o inactivado (VI) por diferentes tiempos. Como control de carga se usó a la proteína GAPDH

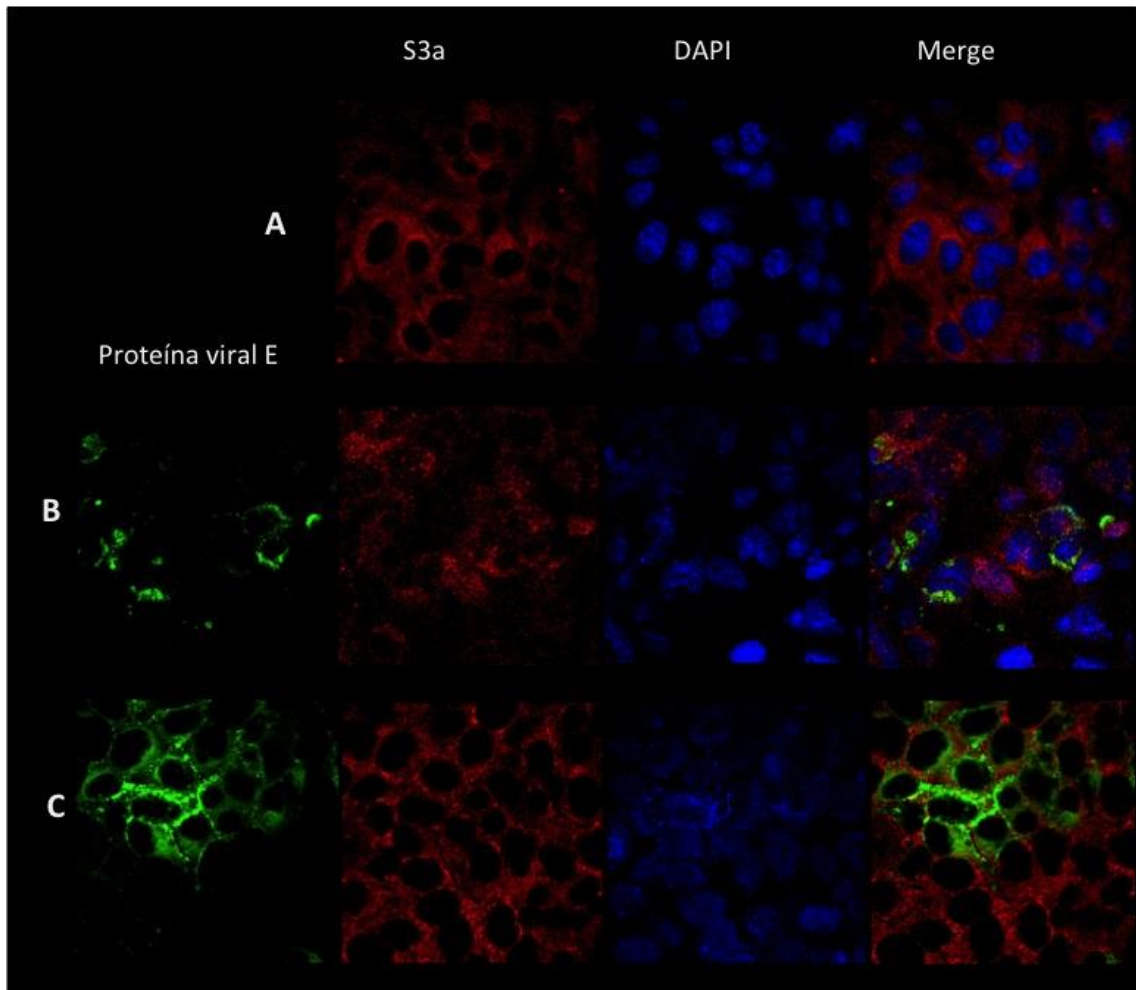


Figura 9. Distribución subcelular de la proteína S3a en células Huh7 a 48hpi. Las células no infectadas (A) o infectadas con DENV2 (B) o DENV4 (C) fueron incubadas con un anticuerpo anti-S3a y con un anticuerpo anti-E para marcar a las células infectadas. En rojo (Alexa 555) se observa a la proteína S3a y en verde (Alexa 488) a la proteína viral E. En azul se marcan los núcleos teñidos con DAPI.

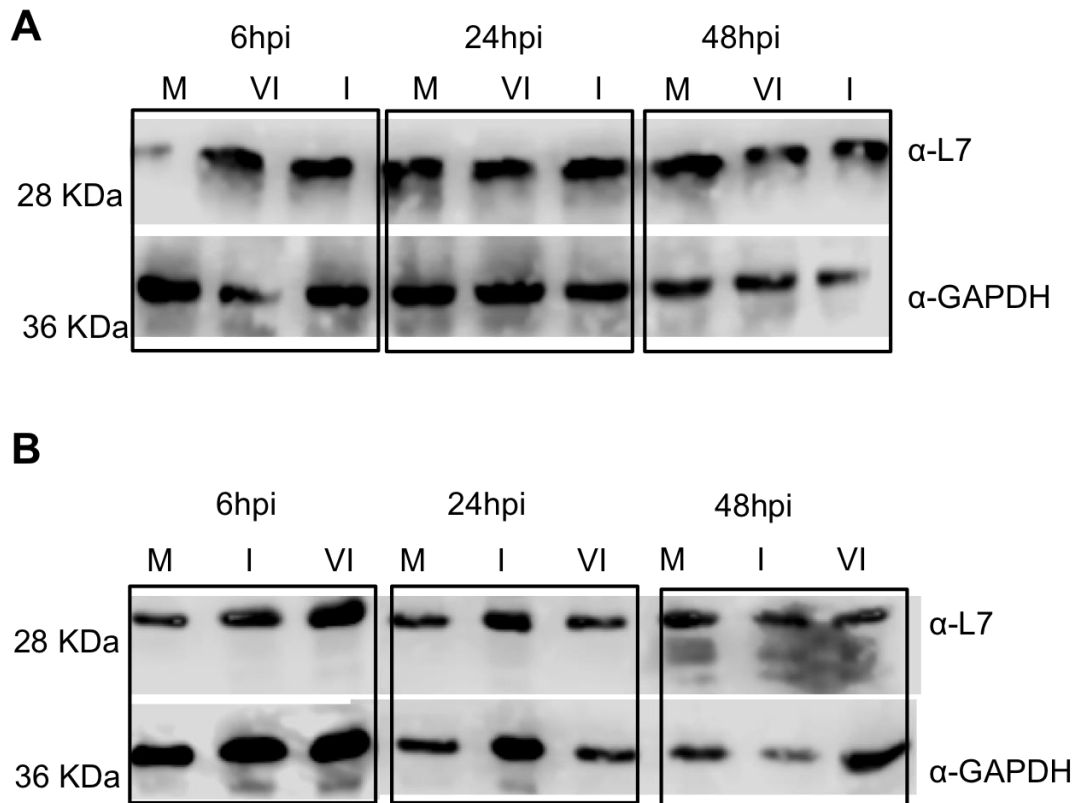


Figura 10. Evaluación de la cantidad de proteína ribosomal L7 a diferentes tiempos post-infección. Las células Huh-7 no infectadas (M), o infectadas con DENV2 (A) o con DENV4 (B) activo (I) o inactivado (VI) por diferentes tiempos se usaron para purificar las proteínas totales las cuales se separaron en SDS-PAGE y se sometieron a Western-blot con anticuerpo anti-L7 y GAPDH. El peso molecular de cada una de las proteínas se indica del lado izquierdo de la figura, mientras que del lado derecho se indica el nombre de la proteína detectada por el anticuerpo.

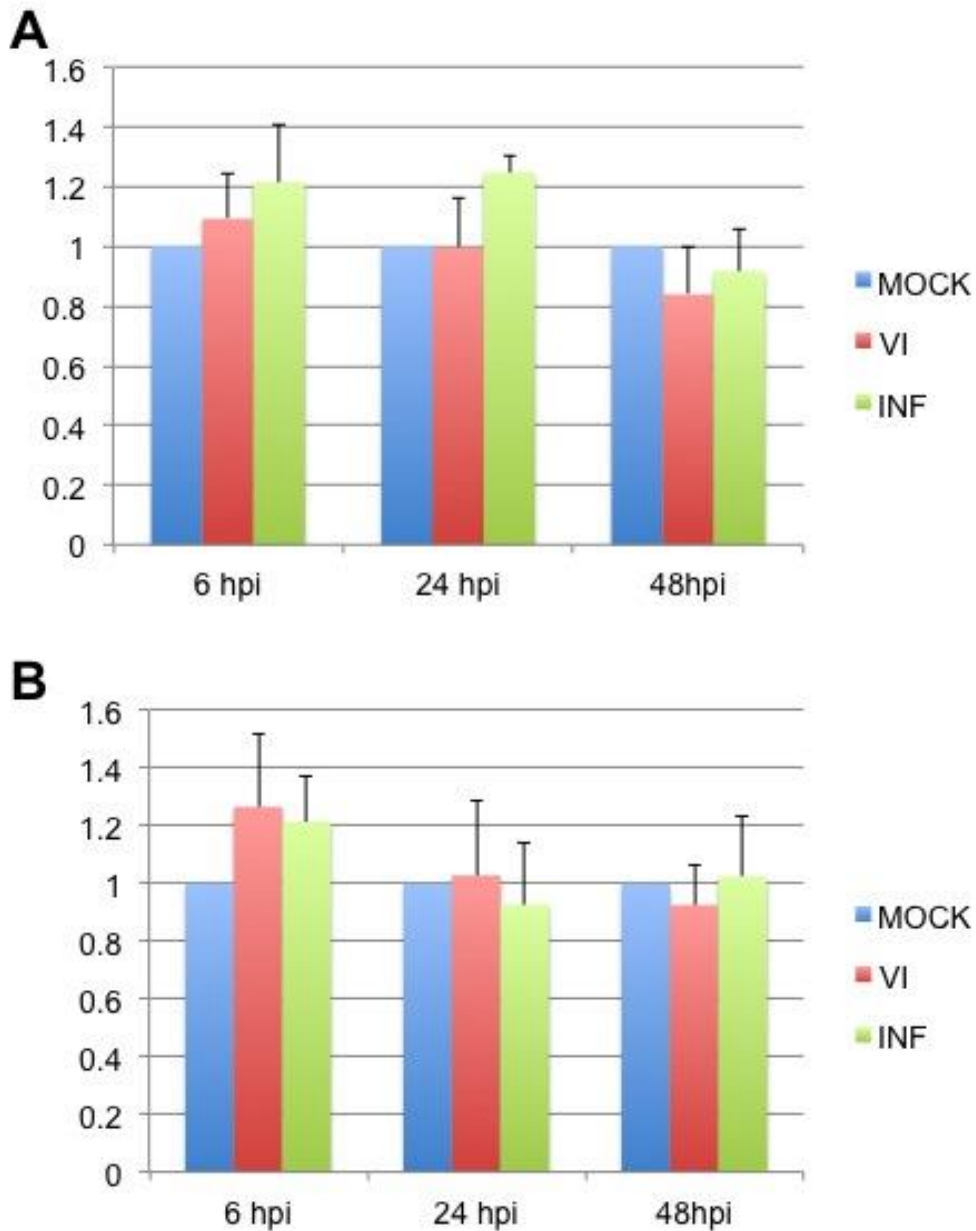


Figura 11. Análisis densitométrico de la cantidad de proteína ribosomal L7 a diferentes tiempos post-infección. Se realizó el análisis densitométrico de la proteína L7 de las células Huh-7 no infectadas (Mock) o infectadas con DENV2 (A) o con DENV4 (B) activo (I) o inactivado (VI) por diferentes tiempos. Como control de carga se usó a la proteína GAPDH.

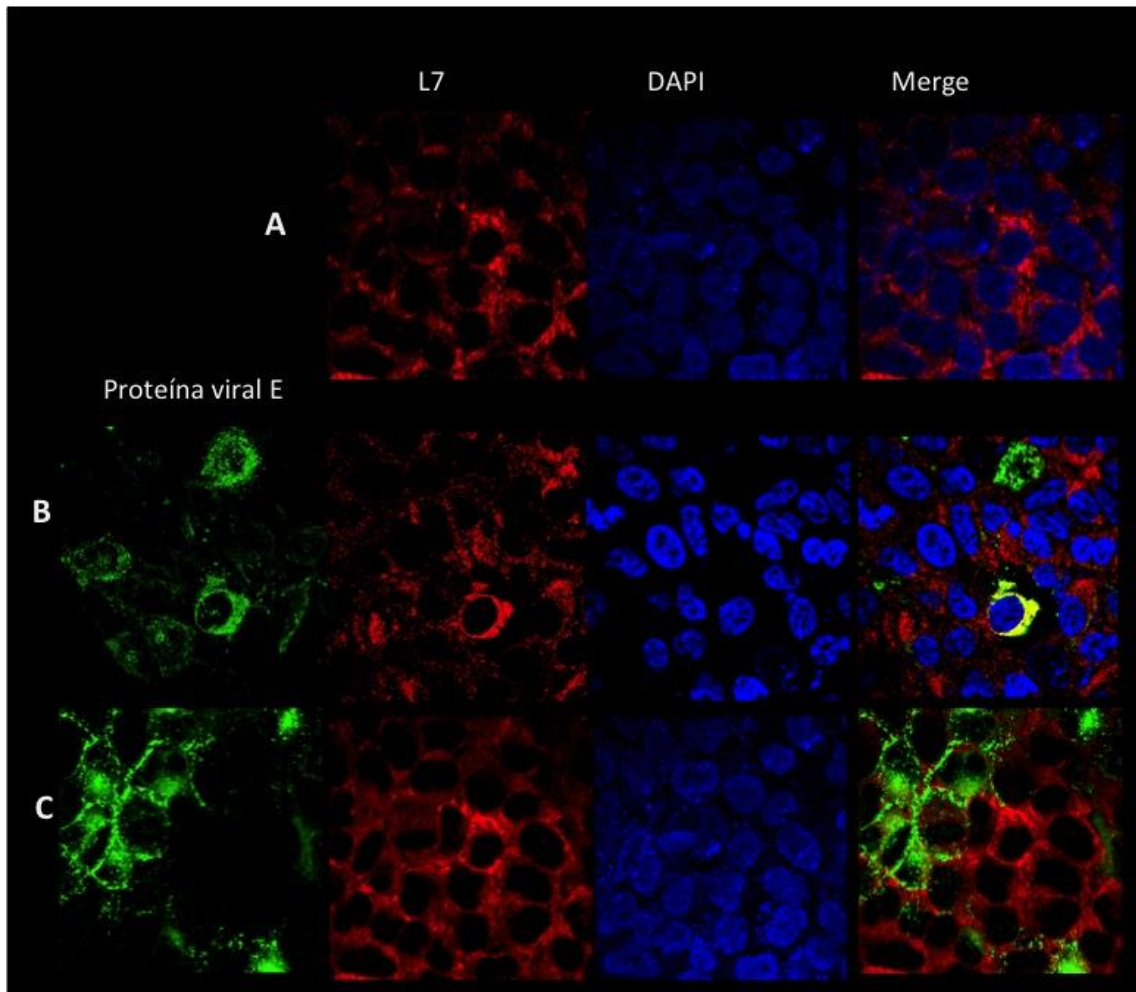


Figura 12. Distribución subcelular de la proteína L7 en células Huh7 a 48hpi. Las células no infectadas (A) o infectadas con DENV2 (B) o DENV4 (C) fueron incubadas con un anticuerpo anti-S3a y con un anticuerpo anti-E para marcar a las células infectadas. En rojo (Alexa 555) se observa a la proteína L7 y en verde (Alexa 488) a la proteína viral E. En azul se marcan los núcleos teñidos con DAPI.

Proteína de choque térmico Hsp70

Para determinar cambios en la cantidad de proteína Hsp70 al infectar células Huh-7 con DENV2 o DENV4, como en el caso de las proteínas ribosomales S3a y L7, se realizaron ensayos de western blot con los extractos protéicos de células Huh-7 no infectadas (Mock) o infectadas, con virus activo o con virus inactivado por diferentes tiempos de 6 a 48 horas. Se marcó a la proteína Hsp70 con un anticuerpo primario anti-Hsp70 y como control de carga se utilizó el anticuerpo anti-GAPDH. Mediante análisis densitométrico no se encontró diferencia en la cantidad de Hsp70 presente en los extractos de células Huh-7 a los distintos tiempos post-infección, ni al comparar los extractos de células infectadas con los de células no infectadas (Mock y virus inactivado) (figura 13 y 14).

Debido a que no se observó un cambio en la cantidad de proteína a los distintos tiempos post-infección, también se decidió evaluar la distribución subcelular de Hsp70 para determinar si la infección con DENV2 o DENV4 traía consigo un cambio en su localización. Para esto, las células Huh-7 no infectadas (Mock) o infectadas con DENV2 o con DENV4 por 48 horas, se permeabilizaron y se bloquearon para incubarlas con anticuerpo primario anti-Hsp70 (ratón 1:75) y anti-NS3 (ratón 1:200) para marcar a las células que estuvieran infectadas y los núcleos se tiñeron con DAPI.

Como se puede observar en la figura 15, Hsp70 marcada en verde, se localiza en todo el citoplasma de las células Huh-7 no infectadas. Mientras que en las células infectadas con DENV2, Hsp70 parece cambiar su localización, distribuyéndose con un patrón similar al que presenta la proteína viral NS3. Sin embargo, este mismo efecto no se observa en las células Huh-7 infectadas con DENV4, en donde Hsp70 no modifica su localización.

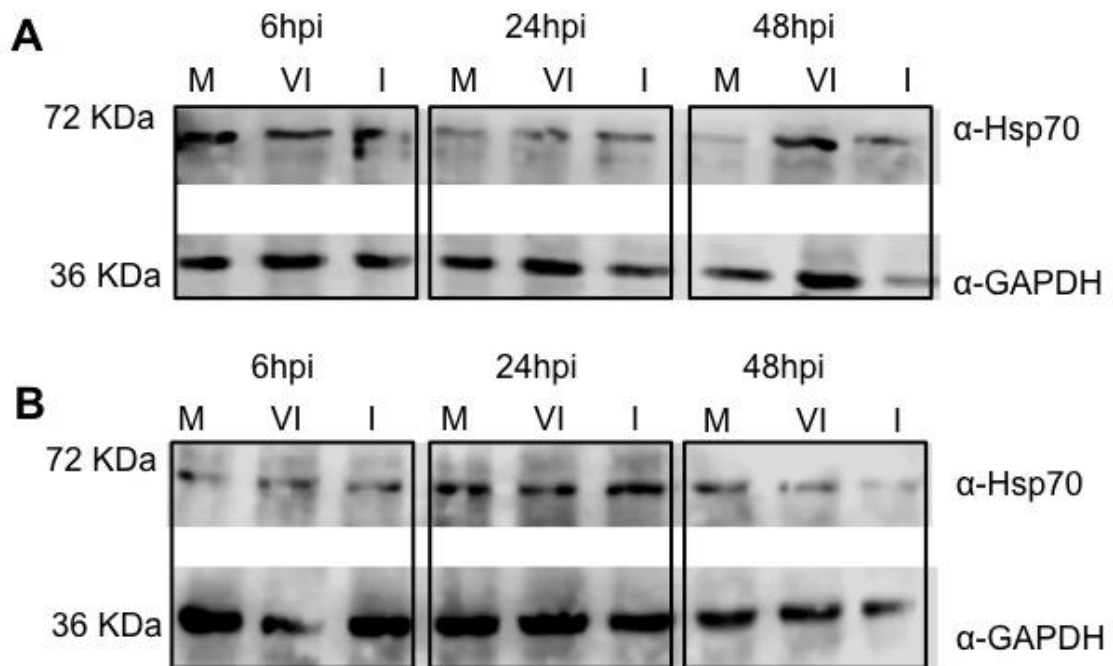


Figura 13. Evaluación de la cantidad de proteína Hsp70 a diferentes tiempos post-infección. Las células Huh-7 no infectadas (M), o infectadas con DENV2 (A) o con DENV4 (B) activo (I) o inactivado (VI) por diferentes tiempos se usaron para purificar las proteínas totales las cuales se separaron en SDS-PAGE y se sometieron a Western-blot con anticuerpo anti-Hsp70 y GAPDH. El peso molecular de cada una de las proteínas se indica del lado izquierdo de la figura, mientras que del lado derecho se indica el nombre de la proteína detectada por el anticuerpo.

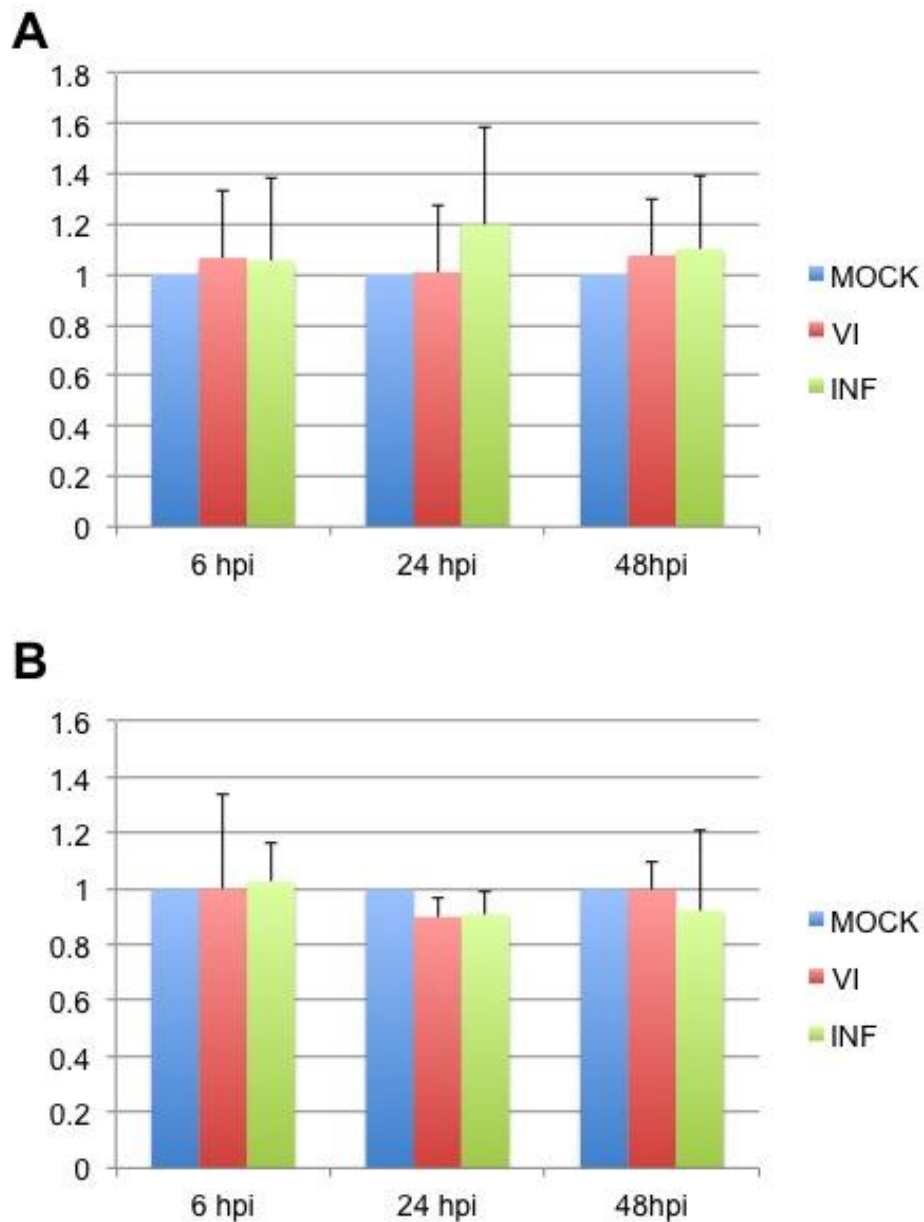


Figura 14. Análisis densitométrico de la cantidad de proteína Hsp70 a diferentes tiempos post-infección. Se realizó el análisis densitométrico de la proteína Hsp70 de las células Huh-7 no infectadas (Mock) o infectadas con DENV2 (A) o con DENV4 (B) activo (I) o inactivado (VI) por diferentes tiempos. Como control de carga se usó a la proteína GAPDH.

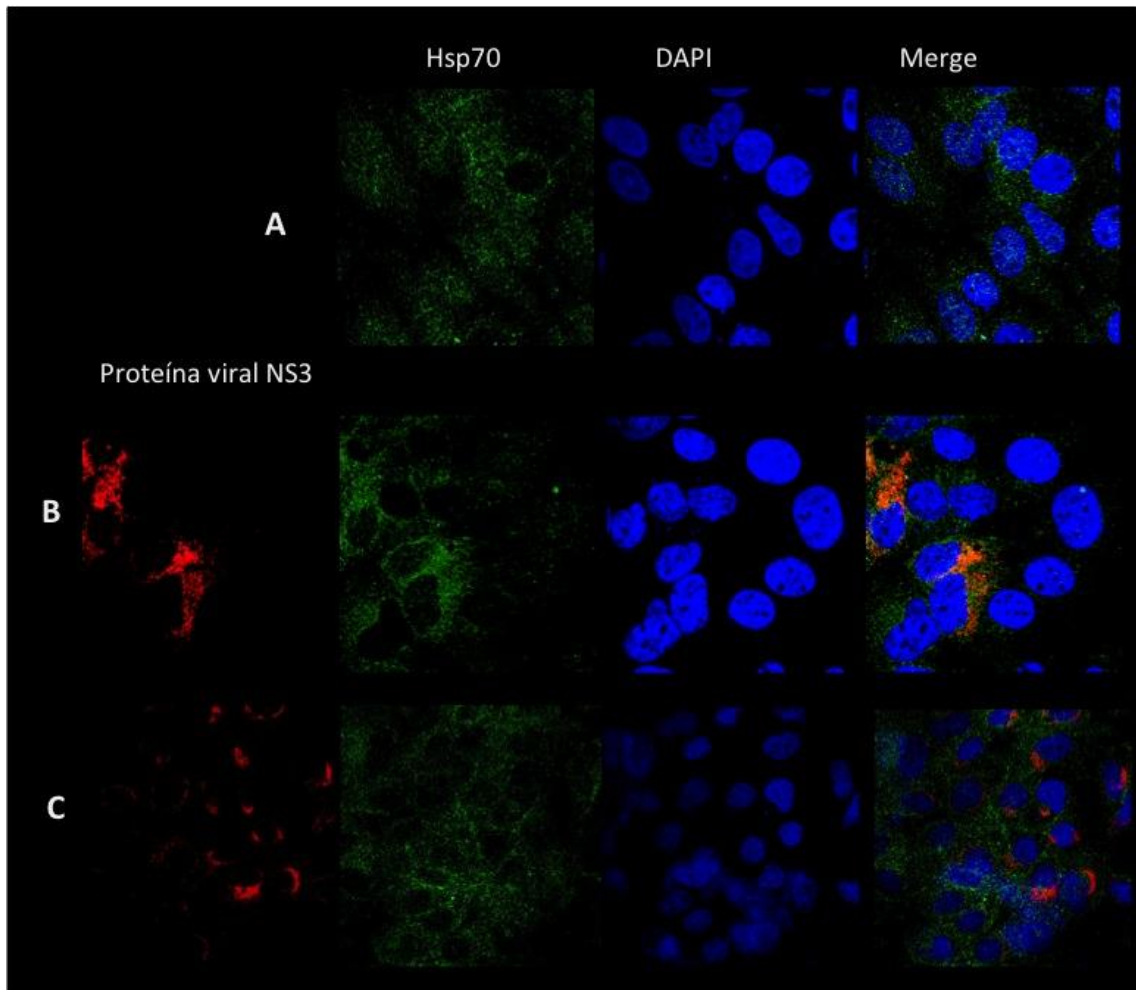


Figura 15. Distribución subcelular de la proteína Hsp70 en células Huh7 a 48hpi. Las células no infectadas (A) o infectadas con DENV2 (B) o DENV4 (C) fueron incubadas con un anticuerpo anti-Hsp70 y con un anticuerpo anti-NS3 para marcar a las células infectadas. En verde (Alexa 488) se observa a Hsp70 y en rojo (Alexa 555) a la proteína viral NS3. En azul se marcan los núcleos teñidos con DAPI.

Obtención de la proteína NS1 recombinante

Para poder realizar el ensayo de overlay y confirmar la interacción entre NS1 y las proteínas S3a, L7 y Hsp70, primero se obtuvo la proteína NS1 recombinante (NS1r) y pura. Para la obtención de NS1 recombinante se transformaron bacterias *E. coli* BL-21 con el plásmido p-ProEX-NS1, por medio de choque térmico y se indujo a la proteína a 37°C con 1M de IPTG por 20 horas. Las bacterias fueron recuperadas y lisadas para obtener la fracción soluble, que fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), este gel fue transferido a una membrana

de nitrocelulosa y se incubó con un anticuerpo anti-Histidinas, el cual detectó una banda de aproximadamente 37 kDa de la fracción inducida, la cual no fue detectada en la fracción sin inducir (Figura 16) confirmando que se obtuvo NS1.

Debido a que NS1r se clonó fusionada a una bandera de histidinas, el proceso de purificación de la proteína se realizó mediante cromatografía de afinidad a cobalto empleando la fracción soluble de las bacterias inducidas a 37°C por 20 horas. La mayor parte de las proteínas que no se unieron a la resina fueron eliminadas desde el primer lavado (Figura 17). Con el fin de eluir todas las proteínas de origen bacteriano que se estuvieran uniendo de manera inespecífica a la resina, se realizaron cinco lavados con concentraciones crecientes de imidazol (Figura 17), con ninguno de estos lavados se separó la proteína NS1r de la resina, NS1r puede observarse a 37 kDa en el gel (Figura 17, carril R).

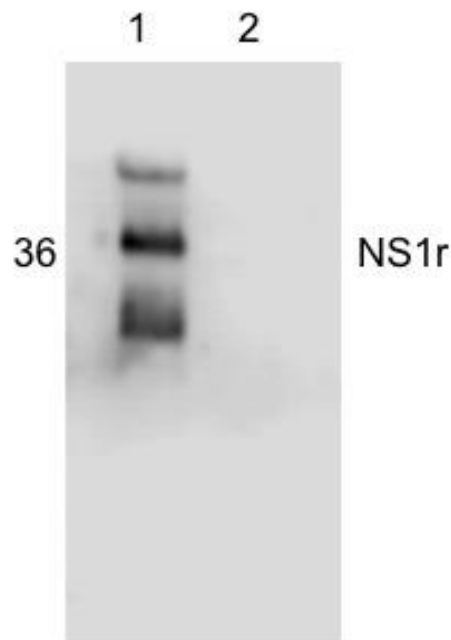


Figura 16. Proteína NS1r para ensayos de overlay. La proteína NS1r unida a la resina fue sometida a electroforesis en SDS-PAGE al 10% y analizada mediante Western blot empleando un anticuerpo anti-histidinas. A la derecha se señala la proteína NS1r y a la izquierda se indica el peso molecular de las proteínas.



Figura 17. Purificación de NS1r para ensayos de overlay. La proteína NS1r de la fracción soluble de bacterias inducidas a 37°C por 20 horas se unió a resina TALON y se lavó con buffer A (1-3) y concentraciones crecientes de imidazol (4-8). Los lavados (1-8) y la resina (R) se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE al 10% y se tiñeron con azul de coomasie. A la derecha se señala a la proteína NS1r y a la izquierda se indica el peso molecular de las proteínas.

Obtención de la proteína E recombinante

Como control en el ensayo de overlay, se obtuvo a la proteína E recombinante (Er) y pura. Para su obtención, se transformaron bacterias E. coli BL-21 con el plásmido pJR-Er, por medio de choque térmico y se realizó una cinética de inducción a 27, 32 y 37°C utilizando distintas concentraciones de IPTG (0.6, 0.8 y 1 mM) por 6 horas. Las bacterias fueron recuperadas y lisadas para obtener la fracción soluble, que fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Un duplicado de este gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y se incubó con un anticuerpo anti-Histidinas. En el gel teñido con azul de Coomasie se observó la presencia de una proteína de aproximadamente 55 kDa (figura 18 A) la cual fue reconocida por el anticuerpo anti-histidinas (figura 18 B) sugiriendo que se trata de Er. Asimismo, se observa que a 27 y a 32°C se logra inducir Er utilizando IPTG a 0.6, 0.8 y 1 mM, es por esto que para el ensayo de overlay se decidió inducir la proteína Er a 32°C con IPTG

1mM.

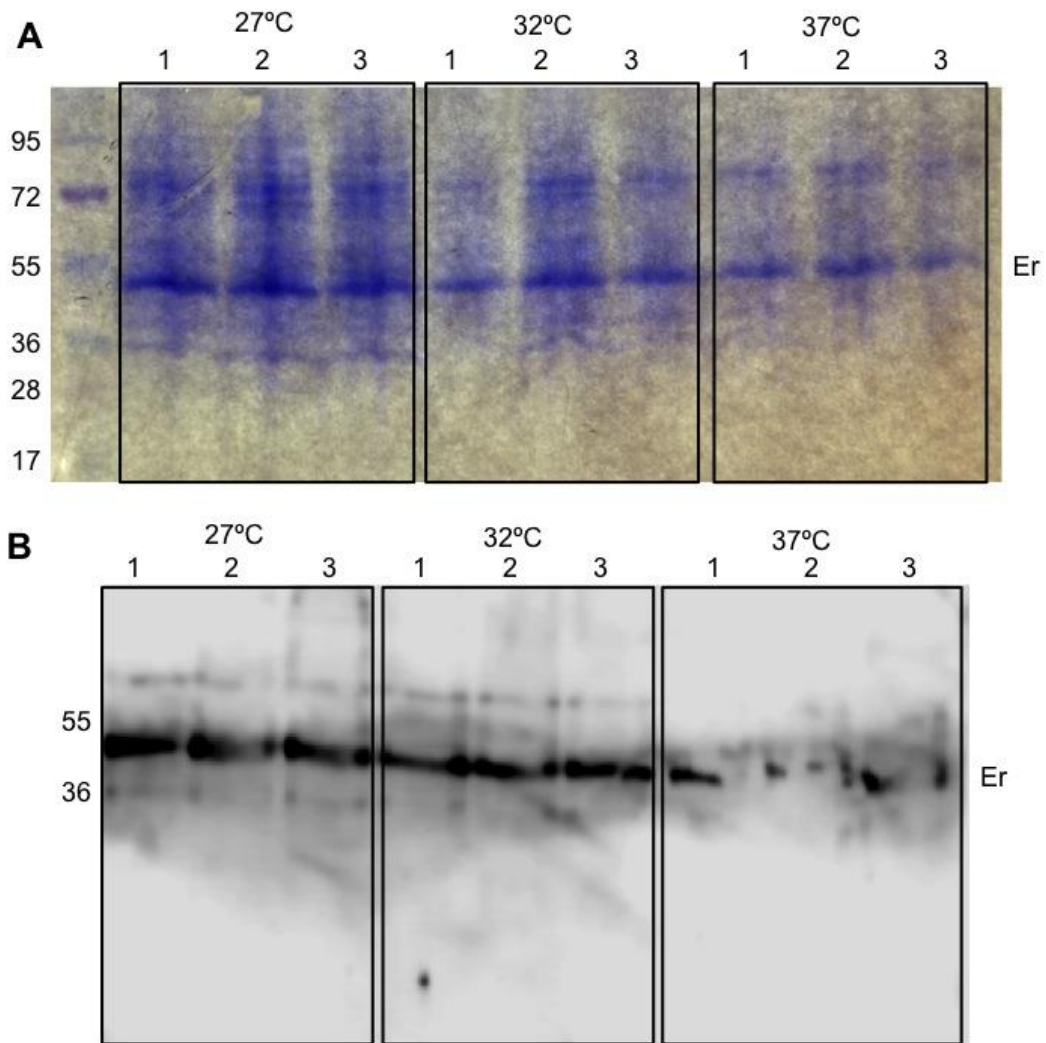


Figura 18. Cinética inducción de Er para ensayos de overlay. Los sobrenadantes de bacterias inducidas con 0.6 (1), 0.8 (2) y 1 mM (3) de IPTG a 27, 32 o 37°C por 6 hora fueron sometidos a electroforesis en SDS-PAGE al 10% y teñidos con azul de coomasie (A) y analizados mediante Western blot empleando un anticuerpo anti-histidinas (B). A la derecha se señala la proteína Er y a la izquierda se indica el peso molecular de las proteínas.

DISCUSIÓN

Los virus son parásitos intracelulares obligatorios, que debido a su austeridad genética, requieren de estructuras, organelos y moléculas de la célula tales como nucleótidos, lípidos, carbohidratos y proteínas para crear un ambiente favorable para su reproducción dentro de la misma. Por el contrario, la célula huésped contrarresta la infección viral expresando proteínas que se unen, degradan o inhiben a las proteínas virales. Diversos grupos de investigación han realizado estudios para definir las interacciones entre los virus y la célula huésped, lo cual ha permitido entender de mejor manera cómo es que los virus se reproducen y causan enfermedades, así como comparar las estrategias que usan distintos virus para manipular a la célula huésped y de este modo revelar nuevos blancos para intervención terapéutica. Es así como se ha logrado identificar la interacción de las proteínas de DENV con varias proteínas celulares.

Los ensayos de doble híbrido de alto rendimiento, así como la purificación por co-afinidad; sumado a la espectrometría de masas han permitido identificar interacciones proteína-proteína a gran escala y de esta forma se han creado redes de interacción de proteínas humanas que proveen un contexto más amplio para entender las interacciones virus-célula huésped. Con ensayos de doble híbrido se han identificado proteínas humanas que interactúan con proteínas de DENV, entre estas se encuentra una gran cantidad de proteínas relacionadas con la cascada del complemento y de coagulación, al centrosoma y de citoesqueleto, así como proteínas involucradas en unión a RNA, regulación de la transcripción, transporte vesicular y regulación de la respuesta inmune innata (Chua et al. 2005; Khadka et al. 2011; Le Breton et al. 2011)

La proteína NS1 de DENV ha demostrado ser multifuncional, esta implicada en replicación y en la patogenia de la infección causada por el virus. Se ha encontrado que NS1 se une a distintos componentes de la vía del complemento y a otras proteínas regulatorias de la célula huésped. Entre estas proteínas se encuentra el factor de regulación del complemento H (fH),

las proteínas del complemento C4b, hnRNP C1/C2, STAT3 β , C1q, así como proteínas involucradas en traducción y citoesqueleto (Muller y Young 2013; Silva et al. 2013; Avirutnan et al. 2011; Khadka et al. 2011; Noisakran et al. 2008; Chua et al. 2005). Debido a que la función precisa de esta proteína en la replicación viral aún se desconoce, en nuestro laboratorio Cervantes-Salazar, M. (2011) aisló e identificó proteínas de una línea celular hepática (que son el segundo blanco relevante de la infección por DENV) que interactúan con NS1 recombinante, encontrando proteínas del citoesqueleto como actina, proteínas ribosomales, entre las que se encuentra S3a y L7; así como proteínas de choque térmico, como Hsp70, entre otras.

La proteína ribosomal S3a es un componente estructural de la subunidad ribosomal 40S y esta directamente involucrada en la síntesis de proteínas en eucariontes por medio de la interacción con la región 3V del RNAr 18S, RNAm, los factores de iniciación eIF-2 y -3, y los factores de alargamiento EF-1 y -2. De esta manera, S3a tiene un papel central en la regulación de la traducción. Además se ha demostrado que esta proteína tiene funciones extraribosomales como chaperona y funciones relacionadas con promoción del crecimiento, inhibición de la diferenciación o apoptosis (Kashuba et al. 2005; Lim et al. 2011).

La proteína ribosomal L7 es un componente estructural de la subunidad ribosomal 60S, en su región N-terminal, tiene un dominio de tipo básico de cierre de leucinas (BZIP) que *in vitro* media la homodimerización y la unión estable con DNA y RNA, uniéndose preferencialmente a RNAr 28S y a RNAm (Hemmerich et al. 1993; von Mikecz et al. 1999). Se sabe que esta proteína puede inhibir la traducción libre de RNAm en la célula, lo cual sugiere que tiene un papel regulatorio en el aparato de traducción eucariótico (Neumann et al. 1995).

Por otro lado se sabe que las proteínas de la familia de las Hsp70 tienen funciones de mantenimiento de la célula, en las cuales son parte de los componentes de plegamiento de las proteínas y en las vías de transducción

de señales. A través de la interacción con distintas proteínas, las chaperonas Hsp70 están involucradas en múltiples funciones de la célula y son factores importantes en el desarrollo de procesos patológicos como oncogénesis, enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, envejecimiento e infecciones virales (Mayer y Bukau 2005). Existe evidencia de que Hsp70 es una proteína de la célula huésped importante en la regulación de varios aspectos del ciclo replicativo viral. Hablando específicamente de flavivirus, se identificó a Hsp70 como parte del complejo receptor de DENV en monocitos/macrófagos y en una línea celular de neuroblastoma (Reyes-Del Valle et al. 2005) y también se ha reportado que en el VEJ Hsp70 tiene un papel importante en la regulación de la replicación del VEJ, ya que observaron que esta proteína colocaliza parcialmente en el citoplasma con componentes del complejo de replicación viral y que la reducción de la expresión de Hsp70 resulta en una disminución de la replicación del genoma del VEJ.

La interacción entre NS1 y las proteínas S3a, L7 y Hsp70 lleva a pensar que éstas tienen una posible participación en el ciclo replicativo de DENV. Para corroborar esto, se analizó si había cambios en la cantidad de estas proteínas en extractos de células Huh-7 infectadas con DENV2 y DENV4 a distintos tiempos post-infección, comparando estos extractos con extractos de células mock o células infectadas con virus inactivado. El análisis densitométrico de los western blot realizados, denota que no hay diferencia en la cantidad de proteína S3a, L7 o Hsp70 de extractos de células Huh-7 infectadas con DENV2 o DENV4 a ningún tiempo post-infección, ni comparando los extractos de células infectadas con los controles. Esto puede explicarse por un lado, porque se analizaron extractos totales de células infectadas y se sabe que se infectan aproximadamente el 50% de células a las 48hpi, por lo tanto sería interesante que antes de lisar las células, se separaran sólo aquellas que están infectadas y en los extractos proteicos de estas células se analizara la cantidad de proteína correspondiente. Por otro lado, las tres proteínas son proteínas muy abundantes en la célula, por tanto, es posible que éstas no requieran ser sobreexpresadas durante la infección pues estarían en cantidades

adecuadas. Además, el hecho de que no haya un cambio en la cantidad de proteínas S3a, L7 y Hsp70, no indica que el virus no requiera de estas proteínas para su ciclo replicativo,. En apoyo a ésta idea, se ha reportado que S3a puede llevar a cabo funciones extraribosomales sin ser sobreexpresada (Song, Sakamoto, y Taniguchi 2002), lo que nos lleva a pensar que la participación de S3a en el ciclo replicativo de DENV podría llevarse a cabo sin cambios en su expresión. Asimismo , no existen reportes de cambios en la expresión de la proteína L7, solamente se ha reportado que puede modular la traducción de otras proteínas; por lo tanto, creemos que su participación en el ciclo replicativo de DENV pudiera ser regulando la traducción del genoma viral, aunque es preciso llevar a cabo otros experimentos para corroborar esto. En el caso de Hsp70, existen virus que no modulan la expresión de ésta chaperona, pero otros que la regulan de manera positiva o negativa (Li et al. 2011; Ye et al. 2013)

Por otro lado, se analizó la distribución subcelular de las proteínas S3a, L7 y Hsp70 en células Huh-7 no infectadas e infectadas con DENV2 o DENV4. De esta manera se pudo observar que las tres proteínas se distribuyen de manera uniforme en el citoplasma de las células Huh-7 no infectadas y que en el caso de las proteínas S3a y L7 la infección con DENV2 o DENV4 no cambió su distribución. Mientras que la proteína Hsp70, presentó una redistribución hacia las zonas donde se observa la proteína viral NS3 en las células Huh-7 infectadas con DENV2. Para comprobar que esta redistribución de la proteína Hsp70, se debe a la infección por DENV2, se requiere marcar a otras proteínas virales, así como infectar a las células con los otros serotipos de DENV para determinar si este efecto es exclusivo de DENV2 o también se presenta en otro serotipo. La redistribución de Hsp70, puede indicar que esta proteína es importante para la replicación de DENV y que ésta puede estar teniendo un papel en el ciclo replicativo que no ha sido descrito con anterioridad para DENV, como en el caso de lo reportado para VEJ (Ye et al. 2013), por lo tanto sería interesante continuar con el análisis de esta proteína realizando ensayos que permitan determinar su participación en la replicación de DENV.

Finalmente, se logró inducir y purificar a la proteína recombinante NS1 para realizar un ensayo de overlay que permita corroborar la interacción entre esta proteína y S3a, L7 y Hsp70. Sin embargo, aún falta estandarizar las condiciones idóneas para realizar este ensayo, ya que al incubar la membrana que tiene a la proteína NS1r con los anticuerpos anti-S3a, L7 o Hsp70 no se ha logrado determinar si hay interacción entre estas proteínas, lo cual no indica que no haya tal interacción, sino que tal vez sea necesario realizar un ensayo distinto, como puede ser la coinmunoprecipitación.

CONCLUSIONES

- La expresión de las proteínas S3a, L7 y Hsp70 no se modifica durante la infección de DENV2 o DENV4.
- Las proteínas S3a y L7 no cambian su distribución en células Huh-7 infectadas con DENV2 o DENV4.
- La proteína Hsp70 tiene una redistribución en células Huh-7 infectadas con DENV2.

PERSPECTIVAS

- Medir la cantidad de proteínas S3a, L7 y Hsp70 en extractos de células Huh-7 infectadas con DENV2 o DENV4 que hayan sido separadas por sorting.
- Medir colocalización de S3a, L7 y Hsp70 con NS1
- Realizar ensayo de coinmunoprecipitación para corroborar la interacción entre NS1 y S3a, L7 y Hsp70.
- Silenciar las proteínas S3a, L7 y Hsp70 para determinar si son importantes para que DENV lleve a cabo su ciclo replicativo.

BIBLIOGRAFÍA

- Acheson N. H. 2011. «Introduction to virology». En *Fundamentals of Molecular Virology*, editado por Acheson N. H, 2nd ed., 2-17. John Wiley & Sons.
- Alberts, B, Johnson, A, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, y Walter, P. 2008. *Molecular Biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science.
- Avirutnan, Panisadee, Richard E Hauhart, Pawit Somnuke, Anna M Blom, Michael S Diamond, y John P Atkinson. 2011. «Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (1): 424-33. doi:10.4049/jimmunol.1100750.
- Beissinger, M, y J Buchner. 1998. «How Chaperones Fold Proteins». *Biological Chemistry* 379 (3): 245-59.
- Bollati, Michela, Karin Alvarez, René Assenberg, Cécile Baronti, Bruno Canard, Shelley Cook, Bruno Coutard, et al. 2010. «Structure and Functionality in Flavivirus NS-Proteins: Perspectives for Drug Design». *Antiviral Research* 87 (2): 125-48. doi:10.1016/j.antiviral.2009.11.009.
- Buchy, P., Peeling, R., Artsob, H., Cardoso, J., Dayal-Drager, R., Gubler, D., Guzman, M., et al. 2009. «Laboratory diagnosis and diagnostic tests». En *Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*, 91-106. Geneva: World Health Organization.
- CENAPRECE. 2013. «Enfermedades transmitidas por vector: dengue». <http://www.cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue.html>.
- CENAVECE. 2012. «Panorama epidemiológico de fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue en entidades federativas.» Secretaría de Salud.
- Cervantes-Salazar, M. 2011. «Identificación de proteínas celulares que interactúan con las proteínas virales NS1 y NS5 del virus dengue en la infección de células Huh-7.» Maestría en Ciencias, México, D.F.: Centro de investigación y estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Chen, Y, T Maguire, R E Hileman, J R Fromm, J D Esko, R J Linhardt, y R M Marks. 1997. «Dengue Virus Infectivity Depends on Envelope Protein Binding to Target Cell Heparan Sulfate». *Nature Medicine* 3 (8): 866-71.
- Chua, John Jia-En, Raghavan Bhuvanankantham, Vincent Tak-Kwong Chow, y Mah-Lee Ng. 2005. «Recombinant Non-Structural 1 (NS1) Protein of Dengue-2 Virus Interacts with Human STAT3beta Protein». *Virus Research* 112 (1-2): 85-94. doi:10.1016/j.virusres.2005.03.025.
- Clyde, Karen, Jennifer L Kyle, y Eva Harris. 2006. «Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis». *Journal of Virology* 80 (23): 11418-31. doi:10.1128/JVI.01257-06.

- Colpitts, Tonya M, Sebastian Barthel, Penghua Wang, y Erol Fikrig. 2011. «Dengue Virus Capsid Protein Binds Core Histones and Inhibits Nucleosome Formation in Human Liver Cells». *PloS One* 6 (9): e24365. doi:10.1371/journal.pone.0024365.
- De la Cruz-Hernández, Sergio I, Hilario Flores-Aguilar, Silvia González-Mateos, Irma López-Martínez, Celia Alpuche-Aranda, Juan E Ludert, y Rosa M del Angel. 2013. «Determination of Viremia and Concentration of Circulating Nonstructural Protein 1 in Patients Infected with Dengue Virus in Mexico». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88 (3): 446-54. doi:10.4269/ajtmh.12-0023.
- Fernandez-Garcia, Maria-Dolores, Michela Mazzon, Michael Jacobs, y Ali Amara. 2009. «Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell». *Cell Host & Microbe* 5 (4): 318-28. doi:10.1016/j.chom.2009.04.001.
- Fischl, Wolfgang, y Ralf Bartenschlager. 2011. «Exploitation of Cellular Pathways by Dengue Virus». *Current Opinion in Microbiology* 14 (4): 470-75. doi:10.1016/j.mib.2011.07.012.
- Gubler, D J. 1998. «Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever». *Clinical Microbiology Reviews* 11 (3): 480-96.
- Hemmerich, P., A. von Mikecz, F. Neumann, O. Sözeri, G. Wolff-Vorbeck, R. Zobelein, y U. Krawinkel. 1993. «Structural and Functional Properties of Ribosomal Protein L7 from Humans and Rodents». *Nucleic Acids Research* 21 (2): 223-31.
- Kashuba, Elena, Mariya Yurchenko, Krisztina Szirak, Joachim Stahl, George Klein, y Laszlo Szekely. 2005. «Epstein-Barr Virus-Encoded EBNA-5 Binds to Epstein-Barr Virus-Induced Fte1/S3a Protein». *Experimental Cell Research* 303 (1): 47-55. doi:10.1016/j.yexcr.2004.08.025.
- Khadka, Sudip, Abbey D Vangeloff, Chaoying Zhang, Prasad Siddavatam, Nicholas S Heaton, Ling Wang, Ranjan Sengupta, et al. 2011. «A Physical Interaction Network of Dengue Virus and Human Proteins». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 10 (12): M111.012187. doi:10.1074/mcp.M111.012187.
- Korobeinikova, A V, M B Garber, y G M Gongadze. 2012. «Ribosomal Proteins: Structure, Function, and Evolution». *Biochemistry. Biokhimiia* 77 (6): 562-74. doi:10.1134/S0006297912060028.
- Kuhn, J. R. 2011. «The Flaviviruses». En *Fundamentals of Molecular Virology*, editado por N. H Acheson, 2nd ed., 137-47. John Wiley & Sons.
- Le Breton, Marc, Laurène Meyniel-Schicklin, Alexandre Deloire, Bruno Coutard, Bruno Canard, Xavier de Lamballerie, Patrice Andre, Chantal Rabourdin-Combe, Vincent Lotteau, y Nathalie Davoust. 2011. «Flavivirus NS3 and NS5 Proteins Interaction Network: A High-Throughput Yeast Two-Hybrid Screen». *BMC Microbiology* 11: 234. doi:10.1186/1471-2180-11-234.
- Li, Gang, Junjie Zhang, Xiaomei Tong, Wenjun Liu, y Xin Ye. 2011. «Heat Shock Protein 70 Inhibits the Activity of Influenza A Virus Ribonucleoprotein and Blocks the Replication of Virus in Vitro and in Vivo». *PloS One* 6 (2): e16546. doi:10.1371/journal.pone.0016546.

- Lim, Keo-Heun, Kyun-Hwan Kim, Seong Il Choi, Eun-Sook Park, Seung Hwa Park, Kisun Ryu, Yong Kwang Park, et al. 2011. «RPS3a over-Expressed in HBV-Associated Hepatocellular Carcinoma Enhances the HBx-Induced NF-κB Signaling via Its Novel Chaperoning Function». *PloS One* 6 (8): e22258. doi:10.1371/journal.pone.0022258.
- Lindström, Mikael S. 2009. «Emerging Functions of Ribosomal Proteins in Gene-Specific Transcription and Translation». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379 (2): 167-70. doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.083.
- Mairiang, Dumrong, Huamei Zhang, Ann Sodja, Thilakam Murali, Prapat Suriyaphol, Prida Malasit, Thawornchai Limjindaporn, y Russell L Finley Jr. 2013. «Identification of New Protein Interactions between Dengue Fever Virus and Its Hosts, Human and Mosquito». *PloS One* 8 (1): e53535. doi:10.1371/journal.pone.0053535.
- Mangold, Karen A, y Sally L Reynolds. 2013. «A Review of Dengue Fever: A Resurging Tropical Disease». *Pediatric Emergency Care* 29 (5): 665-669; quiz 670-671. doi:10.1097/PEC.0b013e31828ed30e.
- Mayer, M P, y B Bukau. 2005. «Hsp70 Chaperones: Cellular Functions and Molecular Mechanism». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62 (6): 670-84. doi:10.1007/s00018-004-4464-6.
- Miller, Sven, Stefan Kastner, Jacomine Krijnse-Locker, Sandra Bühler, y Ralf Bartenschlager. 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 (12): 8873-82. doi:10.1074/jbc.M609919200.
- Mukhopadhyay, Suchetana, Richard J Kuhn, y Michael G Rossmann. 2005. «A Structural Perspective of the Flavivirus Life Cycle». *Nature Reviews. Microbiology* 3 (1): 13-22. doi:10.1038/nrmicro1067.
- Muller, David A, y Paul R Young. 2013. «The Flavivirus NS1 Protein: Molecular and Structural Biology, Immunology, Role in Pathogenesis and Application as a Diagnostic Biomarker». *Antiviral Research* 98 (2): 192-208. doi:10.1016/j.antiviral.2013.03.008.
- Narro, José, y Héctor Gómez. 1995. «El dengue en México: un problema prioritario de salud pública». *Salud Pública de México* 37 (Su1): 12-20.
- Neumann, F, P Hemmerich, A von Mikecz, H H Peter, y U Krawinkel. 1995. «Human Ribosomal Protein L7 Inhibits Cell-Free Translation in Reticulocyte Lysates and Affects the Expression of Nuclear Proteins upon Stable Transfection into Jurkat T-Lymphoma Cells». *Nucleic Acids Research* 23 (2): 195-202.
- Neumann, F, y U Krawinkel. 1997. «Constitutive Expression of Human Ribosomal Protein L7 Arrests the Cell Cycle in G1 and Induces Apoptosis in Jurkat T-Lymphoma Cells». *Experimental Cell Research* 230 (2): 252-61. doi:10.1006/excr.1996.3417.
- Noisakran, Sansanee, Suchada Sengsai, Visith Thongboonkerd, Rattiyaporn Kanlaya, Supachok Sinchaikul, Shui-Tein Chen, Chunya Puttikhunt, et al. 2008. «Identification of Human hnRNP C1/C2 as a Dengue Virus NS1-Interacting Protein». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 372 (1): 67-72.

doi:10.1016/j.bbrc.2008.04.165.

- Paranjape, S. M, y Harris, E. 2010. «Control of dengue virus translation and replication». En *Dengue virus*, editado por Rothman, A.L, 16-31. New York: Springer.
- Perera, Rushika, y Richard J Kuhn. 2008. «Structural Proteomics of Dengue Virus». *Current Opinion in Microbiology* 11 (4): 369-77. doi:10.1016/j.mib.2008.06.004.
- Reyes-Del Valle, Jorge, Salvador Chávez-Salinas, Fernando Medina, y Rosa M Del Angel. 2005. «Heat Shock Protein 90 and Heat Shock Protein 70 Are Components of Dengue Virus Receptor Complex in Human Cells». *Journal of Virology* 79 (8): 4557-67. doi:10.1128/JVI.79.8.4557-4567.2005.
- Reyes-del Valle, Jorge, y Rosa M del Angel. 2004. «Isolation of Putative Dengue Virus Receptor Molecules by Affinity Chromatography Using a Recombinant E Protein Ligand». *Journal of Virological Methods* 116 (1): 95-102.
- Rigau-Pérez, J G, G G Clark, D J Gubler, P Reiter, E J Sanders, y A V Vorndam. 1998. «Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever». *Lancet* 352 (9132): 971-77.
- Rodenhuis-Zybert, Izabela A, Jan Wilschut, y Jolanda M Smit. 2010. «Dengue Virus Life Cycle: Viral and Host Factors Modulating Infectivity». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 67 (16): 2773-86. doi:10.1007/s00018-010-0357-z.
- Silva, Emiliana M, Jonas N Conde, Diego Allonso, Mauricio L Nogueira, y Ronaldo Mohana-Borges. 2013. «Mapping the Interactions of Dengue Virus NS1 Protein with Human Liver Proteins Using a Yeast Two-Hybrid System: Identification of C1q as an Interacting Partner». *PloS One* 8 (3): e57514. doi:10.1371/journal.pone.0057514.
- Song, Demao, Shuji Sakamoto, y Taketoshi Taniguchi. 2002. «Inhibition of poly(ADP-Ribose) Polymerase Activity by Bcl-2 in Association with the Ribosomal Protein S3a». *Biochemistry* 41 (3): 929-34.
- Tassaneeritthep, Boonrat, Timothy H Burgess, Angela Granelli-Piperno, Christine Trumppfeller, Jennifer Finke, Wellington Sun, Michael A Eller, et al. 2003. «DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells». *The Journal of Experimental Medicine* 197 (7): 823-29. doi:10.1084/jem.20021840.
- Tavaría, M, T Gabriele, I Kola, y R L Anderson. 1996. «A Hitchhiker's Guide to the Human Hsp70 Family». *Cell Stress & Chaperones* 1 (1): 23-28.
- Thepparit, Chutima, y Duncan R Smith. 2004. «Serotype-Specific Entry of Dengue Virus into Liver Cells: Identification of the 37-kilodalton/67-Kilodalton High-Affinity Laminin Receptor as a Dengue Virus Serotype 1 Receptor». *Journal of Virology* 78 (22): 12647-56. doi:10.1128/JVI.78.22.12647-12656.2004.
- Upanan, Supranee, Atichat Kuadkitkan, y Duncan R Smith. 2008. «Identification of Dengue Virus Binding Proteins Using Affinity Chromatography». *Journal of Virological Methods* 151 (2): 325-28. doi:10.1016/j.jviromet.2008.05.001.

- Von Mikecz, A., E. Neu, U. Krawinkel, y P. Hemmerich. 1999. «Human Ribosomal Protein L7 Carries Two Nucleic Acid-Binding Domains with Distinct Specificities». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258 (3): 530-36. doi:10.1006/bbrc.1999.0682.
- Wegele, H, L Müller, y J Buchner. 2004. «Hsp70 and Hsp90--a Relay Team for Protein Folding». *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 151: 1-44. doi:10.1007/s10254-003-0021-1.
- Welsch, Sonja, Sven Miller, Ines Romero-Brey, Andreas Merz, Christopher K E Bleck, Paul Walther, Stephen D Fuller, Claude Antony, Jacomine Krijnse-Locker, y Ralf Bartenschlager. 2009. «Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites». *Cell Host & Microbe* 5 (4): 365-75. doi:10.1016/j.chom.2009.03.007.
- WHO. 2013a. «Dengue and severe dengue. fact sheet No 117». <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>.
- ———. 2013b. «Impact of Dengue». <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>.
- Ye, Jing, Zheng Chen, Bo Zhang, Huan Miao, Ali Zohaib, Qiuping Xu, Huanchun Chen, y Shengbo Cao. 2013. «Heat Shock Protein 70 Is Associated with Replicase Complex of Japanese Encephalitis Virus and Positively Regulates Viral Genome Replication». *PloS One* 8 (9): e75188. doi:10.1371/journal.pone.0075188.