



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTOMICA Y PATOGENESIS
MOLECULAR

“Alteración del complejo del poro nuclear (NPC) por
la proteasa NS3 del virus Zika”

T E S I S

QUE PRESENTA:

DE JESÚS GONZÁLEZ LUIS ADRIÁN

:

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. ROSA MARÍA DEL ANGEL NÚÑEZ DE CÁCERES
DRA. ANA LORENA GUTIÉRREZ ESCOLANO

CIUDAD DE MÉXICO

JULIO, 2018

CRÉDITOS A LAS INSTITUCIONES

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca brindada para realizar este proyecto, el cual se desarrolló en el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), bajo la tutoría de la Dra. Rosa María del Ángel y cotutoría Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano. Este trabajo fue asesorado por la Dra. Patricia Talamás Rohana y el Dr. Juan E. Ludert León profesores e investigadores del CINVESTAV unidad Zacatenco.

TUTORES:

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

ASESORES:

Dra. Patricia Talamás Rohana

Dr. Juan Ernesto Ludert León

NUMERO DE CVU

780737

Agradecimientos

A mi mamá y a mi papá, que fue el principal apoyo para la realización de este trabajo

A mis hermanas, Monse y Ximena que les dedicó esta tesis y que sepan que estaré ahí en cada momento que lo necesiten, las amo.

A la Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres y Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, por aceptarme en su laboratorio, por brindarme su confianza, su paciencia y por proporcionar los recursos y herramientas necesarios para este proyecto.

A mis amigos y compañeros de laboratorio José Humberto Pérez Oláis, Ariana Mahely Monzón Hurtado, Fidel Osuna Ramos, Farfán Morales Noé, José Manuel Reyes Ruiz, Fernando Medina y Jaime Zarco, por su amistad, sus enseñanzas y sus consejos dentro y fuera del laboratorio.

Gracias a mis asesores, Dra. Patricia Talamás Rohana y Dr. Juan Ernesto Ludert León, por su tiempo y sus consejos.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción	3
Epidemiología.....	3
Sintomatología	4
Diagnóstico.....	5
Tratamiento	5
Biología del virus.....	5
Genoma de ZIKV.....	5
Proteínas virales.....	6
Ciclo replicativo de ZIKV	8
Antecedentes	8
Descripción del complejo del poro nuclear (NPC)	8
Participación del complejo del poro nuclear (NPC) en la replicación viral.	13
Nucleoporinas e infecciones virales	13
Alteración del NPC por la proteasa NS3 de Dengue	15
Justificación	17
Hipótesis	17
Objetivo general.....	17
Objetivos particulares	17
Estrategia experimental	18
Materiales y Métodos.....	19
Análisis in silico de NS3.....	19
Cultivo e infección de células Huh7 con ZIKV	20
Plásmido pcDNAplus NS2B3ZIKV.....	20
Propagación del plásmido con el inserto de NS2B3 y NS2B3-S135A de ZIKV.....	21
Ensayo de liberación del inserto de NS2B3 y NS2B3-S135A.....	22
Transfección de células Huh7 con el plásmido que codifica a NS2B-NS3	22
Preparación de extractos de proteínas totales	23
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	23
Transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	24

Western Blot	24
Inmunofluorescencia.....	25
Resultados	26
Análisis in silico de NS3.....	26
Descripción de la estructura y características de NS2B y NS3 de ZIKV	26
Comparación de la triada catalítica de NS3 de ZIKV con otros flavivirus	28
Comparación de la estructura de NS3 de ZIKV y DENV	29
Predicción de sitios de localización (NLS) en NS3 de ZIKV	31
Predicción de secuencias de exporte nuclear (NES) en NS3 de ZIKV...	32
Predicción del procesamiento de nucleoporinas por la NS3 de flavivirus	34
Localización de NS3 en células transfectadas e infectadas con ZIKV	36
Expresión de NS3 de ZIKV en células Huh7 y células transfectadas con	36
NS3	36
Localización de NS3 de ZIKV durante la infección y transfección de	38
células Huh7.....	38
Análisis de la integridad del poro nuclear y nucleoporinas durante la	39
infección con ZIKV y acción de NS3.....	39
Integridad de Nup62 durante la infección con ZIKV y transfección de NS3	40
en células Huh7.....	40
Integridad de Nup98 durante la infección con ZIKV y transfección de NS3	42
en células Huh7.....	42
Integridad de Nup153 durante la infección con ZIKV y transfección de	44
NS3 en células Huh7.....	44
Integridad de TPR durante la infección con ZIKV y transfección de NS3	46
en células Huh7.....	46
Posibles consecuencias de la alteración de Nup98, Nup153 y TPR por	47
NS3 de ZIKV	47
Discusión	49
Conclusiones	54
Perspectivas	55
Bibliografía.....	56

Resumen

El virus Zika (ZIKV) es un virus reemergente, el cual está presente en 84 países del mundo, en 31 países se ha asociado a microcefalia y en 23 países se reportó un aumento del número de casos de Guillain-Barré asociado a la infección por ZIKV. Actualmente no se cuenta con un tratamiento específico y es por ello que estudiar la biología del virus permitirá entender su ciclo de replicación y poder encontrar blancos farmacológicos.

Una proteína indispensable para la replicación de ZIKV es NS3 que tiene función de proteasa y de helicasa. Se ha visto, que la proteína NS3 de DENV, que está relacionada filogenéticamente con la de ZIKV, afecta el complejo del poro nuclear procesando sus proteínas, por lo que se analizó si la NS3 de ZIKV tiene la misma función en el procesamiento/degradación de nucleoporinas durante la replicación viral. En este trabajo se evaluó la integridad del complejo del poro nuclear y específicamente de algunas de las nucleoporinas (Nup62, Nup98, Nup153 y TPR) en células infectadas y transfectadas con la proteasa NS3 activa e inactiva, mediante ensayos de Western Blot y por microscopía confocal. Nuestros resultados demuestran que la transfección de la proteasa activa de NS3 al igual que la infección con ZIKV altera la integridad de Nup98, Nup153 y Nup270 y no la de Nup62. En el laboratorio, se ha visto que durante la infección con DENV se degradan las Nup62, Nup98 y Nup153 y la principal consecuencia de esta degradación es la inhibición del transporte de mRNA al citoplasma.

Las consecuencias de la degradación de las Nups procesadas por la NS3 de ZIKV aún se desconocen. En resumen, nuestros datos demuestran que la actividad de proteasa de NS3 de ZIKV es la responsable de degradar a Nup98, Nup153 y Nup270, importantes en el transporte núcleo-citoplasma a través del complejo de poro nuclear.

Abstract

Zika virus (ZIKV) is a re-emerging virus, which is present in 84 countries worldwide, and it has been associated with microcephaly in 31 countries and in 23 countries with an increase in the number of Guillain-Barré cases. Currently, there is no specific treatment available; thus, studying the biology of the virus will allow us to understand its replication cycle and find pharmacological targets.

An indispensable protein for ZIKV replication is NS3, which has both protease and helicase activities. It has been described that DENV NS3 protein, which is phylogenetically related to the one from ZIKV, affects the nuclear pore complex integrity by cleaving some of the proteins. In this work the activity of ZIKV NS3 in the processing/degradation of nucleoporins during viral replication was analyzed. For this purpose, Huh7 cells were transfected with the active and inactive NS3 protease, Huh7 cells were also infected with ZIKV and the integrity of some nucleoporins of the nuclear pore complex was evaluated by Western Blot and confocal microscopy. Our results show that the transfection with the active protease of NS3, as well as infection with ZIKV, alters the integrity of Nup98, Nup153 and Nup270 and not Nup62. In the laboratory, Nup62, Nup98, and Nup153 have shown to be degraded during DENV infection and the main consequence of this degradation is the inhibition mRNA export to the cytoplasm.

The consequences of the degradation of the nucleoporins processed by ZIKV NS3 are still unknown. In summary, our data show that the protease activity of ZIKV NS3 is responsible for degrading Nup98, Nup153, and Nup270, important in nucleus-cytoplasmic.

Introducción

Epidemiología

El virus Zika (ZIKV) pertenece al conjunto de los arbovirus, que se describen como transmitidos por artrópodos; específicamente ZIKV es transmitido por mosquitos del género *Aedes* spp. (Musso & Gubler, 2016). ZIKV está relacionado con otros flavivirus transmitidos por mosquitos que son de importancia médica como SPONV (virus Spondweni), DENV (virus Dengue), YFV (virus de la fiebre amarilla), WNV (virus del oeste del Nilo) y JEV (virus de la encefalitis japonesa) (Lanciotti, Lambert, Holodniy, Saavedra, & del Carmen Castillo Signor, 2016; Musso & Gubler, 2016; Saiz et al., 2016; Song, Yun, Woolley, & Lee, 2017).

El virus Zika fue aislado en abril de 1947 de un mono Rhesus (no. 766), el cual presentaba fiebre, esto durante la vigilancia del virus causante de la fiebre amarilla (YFV) en el bosque de Zika, Uganda. En 1954 se encontró el primer caso de infección del ZIKV en humanos (MacNamara, 1954).

A pesar de que el virus tuvo una pobre transmisión en Asia y África por muchos años, en 2013 se reportó un brote de ZIKV en las islas de la Polinesia Francesa en donde de octubre del 2013 a abril del 2014, se reportaron 32 000 casos sintomáticos que es equivalente al 11.5% de su población. Sin embargo, tras la recolecta de suero de sangre de donadores, se demostró la presencia de IgG contra ZIKV en un 49% de la población, lo que demostró que hubo casos asintomáticos no reportados (Aubry et al., 2017). En enero de 2014 se encontraron los primeros casos de infección con ZIKV en Chile, en específico en la Isla de Pascua, en donde 50 casos se confirmaron por RT-PCR (Tognarelli et al., 2016). Para 2015 se reportaron los primeros casos de infección en Brasil (Zanluca et al., 2015). Pero fue hasta diciembre del 2015, donde el Ministerio de Salud estimó entre 440 000 – 1 300 000 casos de infección con ZIKV en este país (Hennessey M., 2016). También en 2015 se confirmaron por RT-PCR los primeros casos en México, 35 en Yucatán y 10 en Veracruz. Para mayo del 2015, 11 estados de la República Mexicana reportaron casos de infección (Díaz-Quíñonez et al., 2016). La Secretaria de Salud de México

reportó que de 2015-2017 hubo 9 378 casos de ZIKV autóctono (Secretaría de Salud, 2017).

El 9 de marzo de 2017 la OMS reportó 84 países con transmisión vectorial de ZIKV, 31 países con reporte de microcefalia y 23 países con asociación de ZIKV y Síndrome de Guillain-Barré (OMS, 2017).

Sintomatología

Después de la inoculación del virus por la picadura de mosquitos infectados, transcurren entre 3-12 días para la aparición de los síntomas. El 20% de los casos serán sintomáticos y el 80% de los individuos permanecerán como asintomáticos. Se ha descrito que los humanos son susceptibles a la infección por ZIKV en todas las edades, aunque se ha visto un predominio en mujeres por desarrollar los síntomas de la enfermedad (Plourde & Bloch, 2016). Los síntomas por lo regular son inespecíficos como: fiebre, conjuntivitis, erupción maculopapular, mialgia y dolor de cabeza. El diagnóstico para los individuos se retrasa debido a la similitud de los síntomas con otras infecciones como la de DENV (Rabaan, Bazzi, Al-Ahmed, Al-Ghaith, & Al-Tawfiq, 2017).

En algunos casos, la sintomatología difiere de la anteriormente descrita. En el brote de ZIKV en 2015 en Brasil, se reportó un incremento inusual de síndrome de Guillain-Barré y microcefalia en recién nacidos; asimismo la infección se asoció con desórdenes neurológicos, malformaciones congénitas, anormalidades oculares y muerte de fetos de madres infectadas, (Santos et al., 2017). Además, se reportó que el 42% de los casos de mujeres embarazadas sintomáticas, exhibieron anormalidades en el feto, como son: calcificaciones, microcefalia, restricción del crecimiento intrauterino, hipoplasia de cerebelo y tronco encefálico, ventriculomegalia y mielinización retardada. Esta observación se suma a lo reportado en el brote de ZIKV en la Polinesia Francesa, en donde hubo 95 casos de microcefalia en mujeres contagiadas de ZIKV en el primer trimestre de embarazo (Miner & Diamond, 2017).

En el modelo murino se reportó que ZIKV puede infectar testículos, y en particular tiene tropismo por células de Sertoli. También causa atrofia en los túbulos seminíferos, sugiriendo un daño en el proceso de espermatogénesis, asociado con infertilidad (Sheng et al., 2017). Además se ha visto que ZIKV tiene tropismo hacia cerebro, placenta, útero, vagina y ojo; que pueden comprometer la funcionalidad del tejido o favorecer su transmisión (Miner & Diamond, 2017).

Diagnóstico

Debido a la ausencia de síntomas, o a la semejanza entre los producidos por la infección de ZIKV y otros flavivirus, ha sido difícil diagnosticar la infección. Los ensayos más usados para el diagnóstico de ZIKV son: RT-PCR, en el que se amplifican fragmentos de ácidos nucleicos del virus y ELISA que evalúa la presencia de anticuerpos de clase IgM/IgG dirigidos contra el virus en suero o líquido cefalorraquídeo. Por desgracia este último, es poco específico pues existe reacción cruzada con otros flavivirus (Rather, Lone, Bajpai, Paek, & Lim, 2017).

Tratamiento

Actualmente no se cuenta con un tratamiento específico para la infección de ZIKV. Para los pacientes se recomienda reposo, antipiréticos (recomendado para reducir la fiebre), antihistamínicos (recomendados para los salpullidos cutáneos) y analgésicos (para reducir el dolor) (Musso & Gubler, 2016; Shuaib, Stanazai, Abazid, & Mattar, 2016).

Biología del virus

Genoma de ZIKV

El virus Zika, pertenece a la familia *Flaviviridae*. Este virus posee un genoma de RNA de cadena sencilla de sentido positivo, que comprende unos 10 794 pb, que codifican a una poliproteína con una longitud de 3419 - 3423 aa, dependiendo de la cepa (Barzon, Trevisan, Sinigaglia, Lavezzo, & Palù, 2016; Plourde & Bloch, 2016).

Esta poliproteína es traducida como un solo marco de lectura abierto y es procesada por proteasas celulares y virales para generar las proteínas maduras del virus (Medin & Rothman, 2017). En el extremo 5' y 3' del marco de lectura abierto (ORF, del inglés *open reading frame*), se encuentran dos regiones no codificantes (UTR); además, en el extremo 5' posee un CAP y a diferencia de los RNAm celulares en el extremo 3' carece de una cola de poliA, y contiene un CU_{OH}. Ambas regiones UTR participan en la regulación de la traducción y replicación del genoma viral (Saiz et al., 2016; Tilgner & Shi, 2004).

Proteínas virales

La poliproteína una vez procesada proteolíticamente, da origen a 3 proteínas estructurales (C, E y prM), necesarias para la formación de viriones infecciosos y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5), necesarias para la replicación del RNA viral (figura 1). El procesamiento de la poliproteína, está dado por proteínas celulares y NS3 la cual en su extremo N-terminal tiene un dominio serina proteasa, que requiere de su cofactor NS2B para su actividad (Rather et al., 2017; Song et al., 2017).

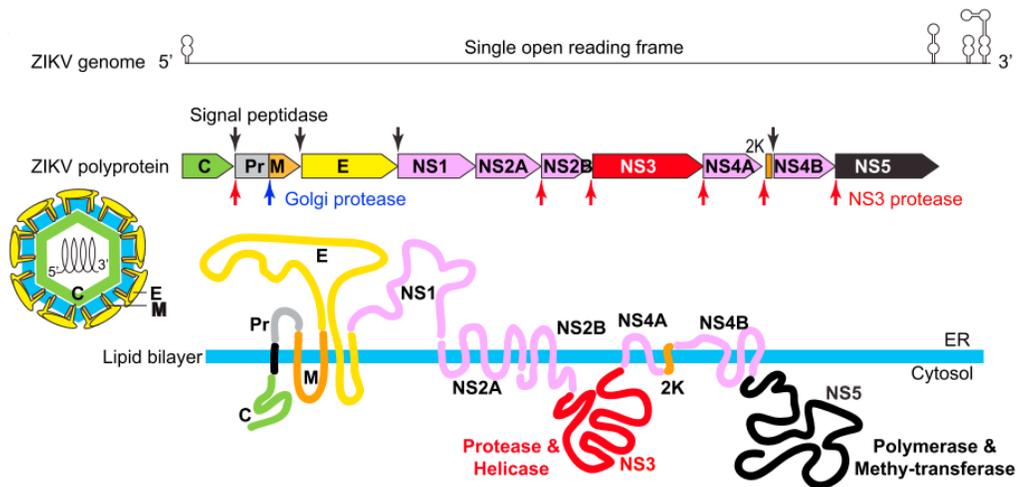


Figura 1: Representación esquemática del genoma de ZIKV y estructura de la poliproteína. Tomado de Ming, Tang, & Song, 2016.

La proteína C o capsida (12 kDa) es un homodímero simétrico, el cual tiene un dominio de unión al RNA viral y un dominio hidrofóbico de interacción con la membrana. La proteína prM o proteína premembrana (20 kDa), se encuentra presente en viriones inmaduros y tiene tres dominios (pr N-terminal, ectodominio central y el dominio transmembranal C-terminal), el dominio pr N-terminal es procesado por la proteasa celular furina, que da como resultado la formación de la proteína M y de viriones maduros. La proteína E o envoltura (53 kDa) tiene un dominio transmembrana y tres ectodominios, ésta participa en el ensamblaje viral, unión a la células blanco, fusión de membrana y también es el blanco de anticuerpos neutralizantes.

La proteína no estructural NS1 (46-55 kDa) es una glicoproteína que participa en la replicación viral, patogénesis y en la evasión del sistema inmune de la célula. La NS2A (25 kDa) participa en el ensamble del virión y es un antagonista en las vías de respuesta de IFN. La proteína NS2B (14 kDa) es un cofactor para la función serina proteasa de NS3, el dominio hidrofílico central proporciona orientación a la NS3, por su parte los dominios terminales hidrofóbicos participan en el anclaje del complejo NS2B-NS3 a la membrana del retículo endoplásmico. La NS3 (69 kDa) tiene un dominio N-terminal con función serina proteasa, que se encarga de procesar la poliproteína viral, mediante la unión de NS2B. El dominio C-terminal tiene función helicasa, que participa en el desenrollamiento del RNA durante la replicación. La NS4A (16 kDa) regula la actividad ATPasa de la helicasa de NS3. El péptido 2k es una señal para el procesamiento de NS4B. Por su parte la NS4B inhibe la fosforilación de STAT1 que conduce al bloqueo de la vía del IFN α y β . La NS5 (103 kDa) es la proteína más grande y conservada del virus, en su dominio N-terminal tiene función metil-transferasa y en su dominio C-terminal tiene función RNA polimerasa dependiente de RNA (Armstrong, Hou, & Tang, 2017; Song et al., 2017; Barzon et al., 2016; Saiz et al., 2016).

Ciclo replicativo de ZIKV

La replicación viral se lleva a cabo en el citoplasma de células infectadas; para ello los viriones se unen a receptores ubicados en la superficie celular, como son la lectina DC-SIGN (usado por otros flavivirus como DENV), TYRO3 y AXL. Una vez unidos a su receptor los viriones ingresan a la célula mediante endocitosis en vesículas recubiertas por clatrina. La acidificación de la vesícula endosómica provoca cambios en el virión, la fusión de las membranas endosomales y víricas, y la liberación del genoma viral. El genoma viral al ser un RNA de cadena (+) es traducido inmediatamente para dar lugar a una poliproteína en el retículo endoplásmico (RE).

La poliproteína es procesada por el complejo NS2B-NS3 (proteasa viral) y por las proteasas celulares para generar las proteínas virales maduras. El genoma viral de sentido positivo se copia para dar lugar a un RNA de sentido (-), que servirá de molde para la síntesis del genoma en sentido positivo (reacción catalizada por proteínas NS como la polimerasa dependiente de RNA NS5). El genoma viral es empaquetado por la proteína C y adquiere la envoltura durante la salida del RE. Los viriones inmaduros son transportados por la vía del trans-golgi, donde se da la glicosilación y escisión de la proteína prM por la proteasa celular furina, generando viriones maduros que son liberados por exocitosis (Barzon et al., 2016; Medin & Rothman, 2017; Mukhopadhyay, Kuhn, & Rossmann, 2005; Saiz et al., 2016).

Antecedentes

Descripción del complejo del poro nuclear (NPC)

Una gran variedad de virus altera el complejo del poro nuclear (NPC) para acceder a las proteínas nucleares que participan en su replicación; esto ocurre para 1) afectar las vías de importe de factores de transcripción y con ello evitar una respuesta antiviral, 2) alterar las vías de exporte de mRNA celular y reducir la cantidad de mRNA celulares en el citoplasma favoreciendo su replicación. Estas

estrategias se han observado tanto para virus cuya replicación ocurre en el núcleo, como para virus citoplasmáticos (Cohen, Au, & Panté, 2011). En estos últimos se ha reportado ampliamente la localización y sobreexpresión de proteínas virales en el núcleo durante la infección, lo que concuerda comúnmente con la inhibición del transporte nuclear, lo que sugiere que las proteínas virales tienen un papel importante en el núcleo hospedero (Lopez-Denman & Mackenzie, 2017a).

Para que las proteínas virales tengan acceso al núcleo, éstas tienen que ser importadas y en ocasiones exportadas, para lo cual, se requiere de su interacción con componentes de la envoltura nuclear, formada por una doble membrana con canales proteicos denominados complejos del poro nuclear (NPCs, del inglés *nuclear pore complexes*). El transporte bidireccional de proteínas implicadas en la señalización (p53, SMAD, etc.), ribonucleoproteínas y otras macromoléculas como mRNA es regulado por el NPC (Lopez-Denman & Mackenzie, 2017a).

Las moléculas pequeñas de aproximadamente 40-50 kDa pueden pasar libremente a través de la envoltura nuclear. Sin embargo, las moléculas de mayor peso molecular (proteínas, mRNA, subunidades de ribosomas y algunos virus), tienen que ser transportados por transporte activo a través de los NPCs. Este transporte (importe y exporte) es regulado por proteínas cargo, receptores de transporte nuclear (NTRs) como importinas, exportinas, transportinas y carioferinas, y pequeñas GTPasas de la familia Ran que regulan la actividad de importinas y exportinas que transportan moléculas cargo (Kabachinski & Schwartz, 2015). Los NTRs reconocen secuencias específicas en las proteínas que cruzan la membrana nuclear (figura 2), como son las secuencias de localización nuclear (NLS) que contienen repetidos de aminoácidos de Arg y Lys. La secuencia clásica está conformada por cinco aminoácidos KKKRK. Sin embargo, algunas proteínas poseen NLS bipartitas que consisten en dos grupos de aminoácidos básicos, separados por aproximadamente 10 aminoácidos. Por su parte las secuencias de exporte nuclear (NES), participan en el tráfico de núcleo a citoplasma y están compuestas por secuencias ricas en leucina (la Cour et al., 2003; Wentz & Rout, 2010).

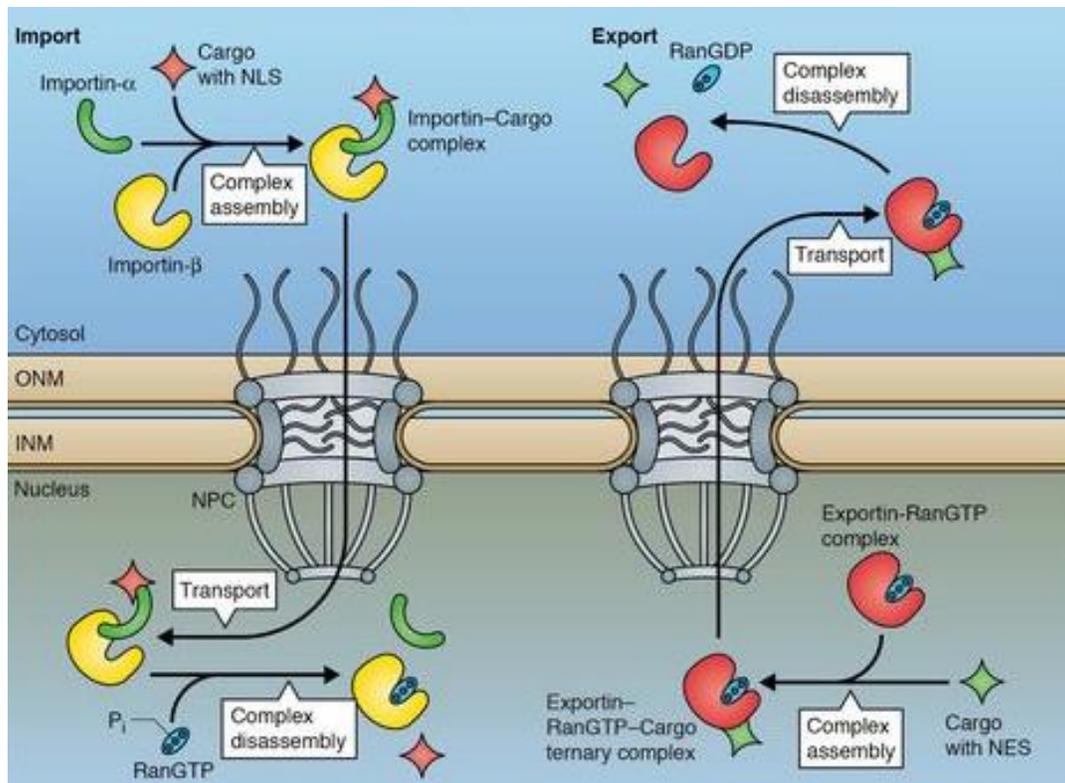


Figura 2: Ciclo de importe y exporte nuclear. El importe nuclear está dado por el reconocimiento de secuencias de localización nuclear (NLS) por parte de los receptores de transporte nuclear (NTRs), por ejemplo, la importina α se une al NLS del cargo, enseguida se une la carioferina importina β , para formar un complejo trimétrico junto a su molécula cargo. Si la NLS es atípica entonces la importina β se une directamente a su molécula cargo sin la participación de la importina α . La direccionalidad del cargo está dada por el gradiente de RanGTP, que es regulado por el ciclo Ran-GTP/GDP. Una vez que el complejo trimérico haya entrado al núcleo, RanGTP que es activada por RCC1 (GEF) se une a la importina β y con ello se libera de su cargo. La importina β es transportada al citoplasma y ahí RanGTP es desactivado a RanGDP por GAP, para liberarse de la importina β para su siguiente ciclo de importe. Por su parte el exporte nuclear está dado por el reconocimiento de las secuencias de exporte nuclear (NES) por parte de la exportina carioferina, enseguida se une RanGTP (activado por RCC1); esto forma el complejo de exporte. El complejo atraviesa el NPC y al salir de éste, GAP desactiva a RanGTP (hidroliza el GTP en GDP) haciendo que la exportina se libere de su cargo (Jovanovic-Talisman & Zilman, 2017; Kabachinski & Schwartz, 2015). Figura tomada de Kabachinski & Schwartz, 2015.

Los núcleos de células HeLa (línea celular epitelial proveniente de cáncer cérvico-uterino) contienen aproximadamente 3 000 NPCs, compuestos por múltiples copias de aproximadamente 30 diferentes proteínas conocidas como nucleoporinas o

Nups, con un peso molecular aproximado de 110-125 MDa las cuales tienen un arreglo cilíndrico (Hezwani & Fahrenkrog, 2017). Las estructuras del NPC (figura 3a) son el anillo citoplasmático, el anillo del poro interno, el anillo nuclear, en la periferia se encuentran la canastilla nuclear y los filamentos citoplasmáticos (Beck & Hurt, 2016; Hezwani & Fahrenkrog, 2017). Dentro del canal central se encuentran Nups con repeticiones ricas en Phe y Gly llamadas FG-NUPs que facilitan el transporte nuclear en ambos sentidos, ya que se unen a NTRs. Algunas de éstas son Nup62, Nup58, Nup54, Nup98, Nup45, Nup214, hCG1, Nup153 y Nup50 (Li, Goryaynov, & Yang, 2016; Rothballer & Kutay, 2012).

Los complejos de las Nups (figura 3b) son:

- ✓ Complejos citoplasmáticos: participan en el importe y exporte de cargos al permitir su unión al NPC, Nup358 contiene dominios de unión a RNA, RanGTP y dominios que participan en el exporte nuclear de subunidades ribosomales.
- ✓ Complejo Y: participan como proteínas de andamiaje.
- ✓ Nups transmembrana: participan en el anclaje del NPC a la envoltura nuclear.
- ✓ Complejo del anillo del poro interior: participan en el exporte e importe de cargos.
- ✓ Complejo Nup62 y Nup98: Nup62 y Nup98 se han localizado en el nucleoplasma y en el citoplasma celular, este complejo se caracteriza por tener dominios repetidos de FG.
- ✓ Complejo de la canastilla nuclear: Nup153 y Tpr contiene dominios FG y de unión a importina β (Beck & Hurt, 2016).

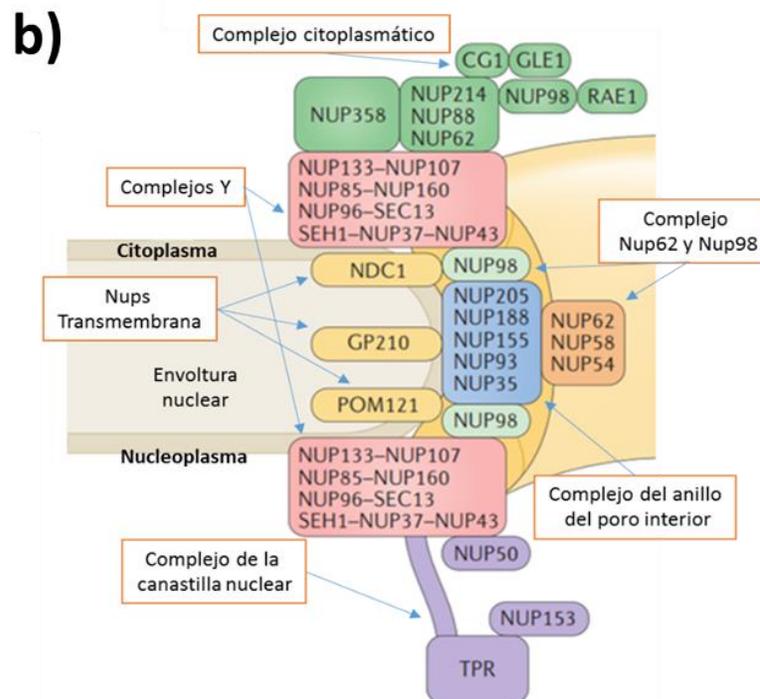
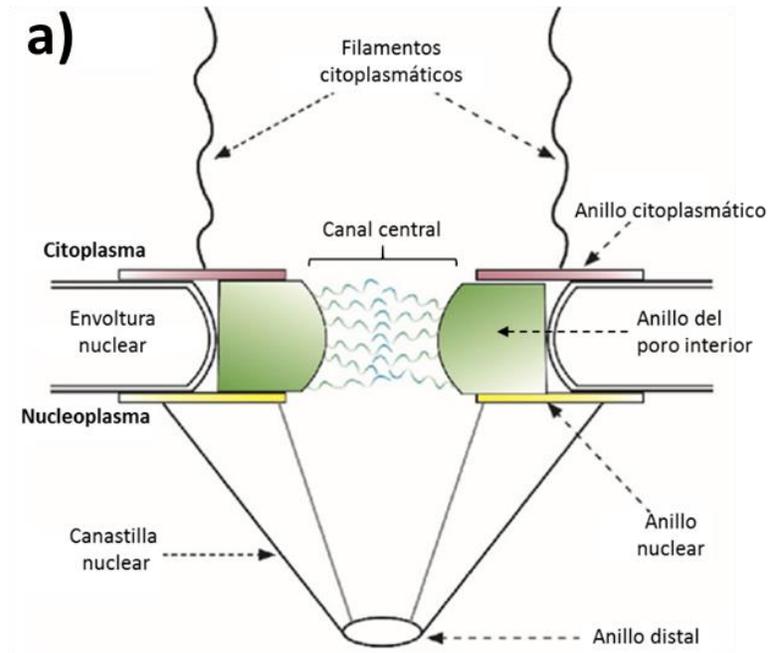


Figura 3: Estructura y composición del complejo del poro nuclear. a) Arquitectura estructural del NPC, b) Complejos de nucleoporinas que componen al NPC. Tomado de Beck & Hurt, 2016; Hezwani & Fahrenkrog, 2017.

Participación del complejo del poro nuclear (NPC) en la replicación viral.

Como se mencionó anteriormente un organelo importante para la replicación viral es el núcleo, y el importe-exporte de proteínas virales y celulares durante la infección, genera alteraciones en dicho transporte que en general se relaciona con el procesamiento de algunas Nups.

Nucleoporinas e infecciones virales

Nup270 o Tpr: Ubicada en la canastilla nuclear, participa en la formación del complejo de exporte de proteínas (Frosst, Guan, Subauste, Hahn, & Gerace, 2002) y exporte de mRNA (Rajanala & Nandicoori, 2012). Se ha visto que el uso de RNAi contra Tpr afecta la transcripción del VIH1 (Marini et al., 2015). Además la proteína p17 de reovirus aviar (ARV) regula la transcripción de Tpr lo que conduce a la acumulación de p53 y p21, esto desactiva la traducción celular deteniendo el ciclo celular y favorece la formación de autofagosomas. En particular la autofagia es importante para la replicación viral ya que los autofagosomas ofrecen una plataforma para la replicación viral y su ensamblaje, además de que en la autofagia se degradan lípidos, que recientemente se ha visto que pueden ser usados como fuente de energía para la replicación de DENV (Huang et al., 2015).

Nup214: La nucleoporina de 214 kDa del complejo citoplasmático participa en la formación del complejo de exporte de proteínas (Hutten & Kehlenbach, 2006) y en el exporte de mRNA (Dickmanns, Kehlenbach, & Fahrenkrog, 2015). Se ha visto que adenovirus 2 usa esta NUP a su favor. Adenovirus 2 importa su genoma a través del NPC de células en interfase para su replicación, para importar su genoma requiere unirse al NPC y Nup214 actúa como receptor para las cápsides, una vez unido a Nup214 éste inserta su genoma en el núcleo (Trotman, Mosberger, Fornerod, Stidwill, & Greber, 2001).

Nup153: La nucleoporina de 153 kDa, ubicada en el complejo de la canastilla nuclear contiene sitios de unión a importina α/β , transportina y RanGTP (Ogawa, Miyamoto, Oka, & Yoneda, 2012) y participa en el exporte de mRNA, snRNA y 5S

rRNA (Dickmanns et al., 2015). Se ha reportado que nup153 une la cápside de VIH-1 a núcleo y la interferencia en la síntesis de nup153 reduce la entrada de las cápsides de VIH-1 en núcleos de linfocitos T CD4⁺ (Chen et al., 2016a). También se ha visto que poliovirus y rinovirus inducen la degradación de Nup153 inhibiendo el importe de proteínas y exporte de mRNA, evadiendo la respuesta inmune antiviral. Además, se ha reportado una deslocalización de proteínas nucleares en infección de poliovirus por la degradación de Nup153 (Gustin & Sarnow, 2001; Watters & Palmenberg, 2011).

Nup98: La nucleoporina de 98 kDa, ubicada en el complejo citoplásmico, participa en el ensamble del complejo de importe (importina α/β y cargo) e interactúa con RanGEF (Oka et al., 2010), además de que participa en el exporte de mRNAs (Blevins, Smith, Phillips, & Powers, 2003). Esta Nup, participa en la entrada del virus de hepatitis C (VHC) en el núcleo al igual que en su biogénesis (Lussignol et al., 2016). En la infección con VIH, Nup98 participa en el importe nuclear de proteínas virales (Chen et al., 2016b). Además, en el caso de respuestas inmunes antivirales por interferones α/β , se sabe que el virus de la estomatitis vesicular (VSV) contiene una proteína matriz que se une a Nup98 inhibiendo la salida de mRNA por el factor de exporte Rae1 (inducido por la acción de interferones), impidiendo un estado antiviral y con ello seguir replicándose (Faria et al., 2005). También se ha observado que poliovirus induce la degradación de la Nup98 con el mismo fin (N. Park, Katikaneni, Skern, & Gustin, 2008).

Nup62: La nucleoporina de 62 kDa, ubicada en el canal central del NPC, participa en el exporte de mRNA e importe de proteínas (Dickmanns et al., 2015). Se ha encontrado que poliovirus degrada a esta NUP, inhibiendo el importe de proteínas y exporte de mRNA, y además se ha evidenciado una deslocalización de proteínas nucleares que promueven la replicación viral (Gustin & Sarnow, 2001). En el caso de rinovirus humano éstos contienen una variedad de proteasas 2A que escinden a Nup62 afectando las vías de importación α/β , transportina 1 y transportina 3, así como la exportación por CRM1 (Watters & Palmenberg, 2011). Por otro lado, la proteína ICP27 de virus herpes simple (HSV-1) se une a Nup62 y con ello afecta el

exporte de mRNAs y su expresión, además afecta el importe vía importina α/β y transportina 1 (Malik et al., 2012).

La integridad de las nucleoporinas y las alteraciones del transporte núcleo-citoplásmico en la infección por ZIKV se desconocen; sin embargo, su estudio permitirá considerar a este proceso como un blanco para inhibir la replicación e infección viral.

Alteración del NPC por la proteasa NS3 de Dengue

Recientemente, el grupo de la Dra. Rosa María Del Ángel, ha estudiado la localización y función de proteínas virales de DENV. Una de ellas es la proteasa NS3, la cual se localiza en el citoplasma y específicamente en el RE donde ejerce su función de serina-proteasa y de helicasa. Para el caso de la actividad serina-proteasa necesita de NS2B la cual actúa como cofactor de NS3. Por estas funciones se ha explorado como blanco farmacológico contra DENV y ZIKV (Kang, Keller, & Luo, 2017; Lopez-Denman & Mackenzie, 2017a).

Curiosamente, a pesar de que se ha descrito que NS3 se localiza en el citoplasma, Cervantes-Salazar et al, (datos no publicados) encontraron una NLS putativa en NS3 de DENV, por tanto, se analizó su localización subcelular. Así, encontraron que la proteína NS3 de DENV y ZIKV se encontraba a las 8 h en núcleo y a las 12 h la mayor parte de la proteína había sido relocalizada al citoplasma. De la misma manera, se observó que durante la infección con DENV se degradan algunas NUPs como lo son Nup98, Nup153 y Nup62. Durante la infección por ZIKV también se observó la degradación de Nups, en este caso fue Nup98 y Tpr. La degradación de Nups inducida por la infección con ambos flavivirus sugieren que la manipulación del transporte núcleo-citoplasma es una estrategia que usan estos virus durante su replicación.

Con el fin de conocer si la proteasa viral NS3 pudiera estar participando en la degradación de las Nups se realizaron ensayos de expresión de la forma mutante de NS3 (S135A) que elimina la actividad proteasa, y se observó que su localización también fue inicialmente nuclear y después citoplasmática como la proteína NS3

silvestre. Sin embargo, no degradó a la estructura del NPC (Mab114), como se observó en ensayos de la expresión de la NS3 silvestre. Confirmando que la NS3 de DENV es la responsable de dañar al NPC.

Debido a que la ruptura de las Nups es diferencial entre ZIKV y DENV será necesario evaluar qué características son distintas entre ambas proteasas que son responsables de inducir procesamiento de Nups. Por último, es importante analizar las posibles consecuencias que tiene este fenómeno en el establecimiento de la infección de ZIKV y que efecto tiene en las vías de importe-exporte.

Justificación

ZIKV es un virus reemergente, el cual se ha encontrado presente en 84 países del mundo, 31 países han reportado microcefalia a causa de este virus y 23 países reportan un aumento del número de casos de Guillain-Barré asociado con esta infección. Actualmente no se cuenta con un tratamiento específico para la infección por ZIKV y es por ello que estudiar la biología del virus permitirá entender su ciclo de replicación y poder encontrar nuevos blancos farmacológicos.

Una proteína indispensable para la replicación de ZIKV es NS3 que tiene función proteasa y helicasa. Se ha visto que NS3 de DENV que está relacionada filogenéticamente con ZIKV, afecta el complejo del poro nuclear procesando sus proteínas, por lo que sería interesante analizar si NS3 de ZIKV tiene la misma función y qué consecuencias tiene el procesamiento-degradación de nucleoporinas en la replicación viral y en la fisiología celular.

Hipótesis

La proteasa NS3 de ZIKV es la responsable del procesamiento de nucleoporinas en células Huh7.

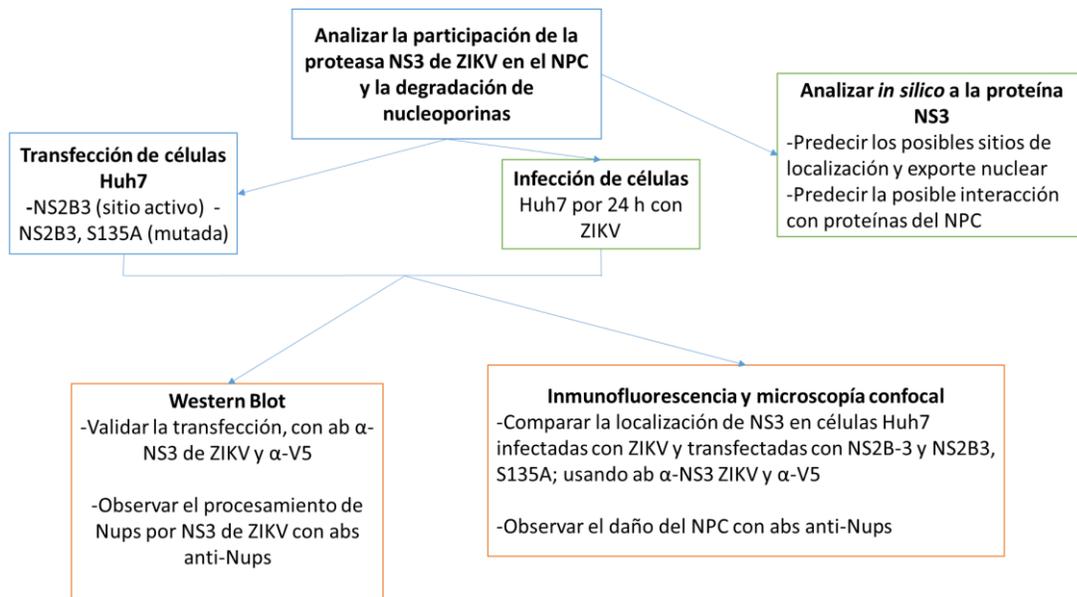
Objetivo general

Analizar la participación de la proteasa NS3 de ZIKV en la integridad del NPC

Objetivos particulares

- ✓ Analizar *in silico* la secuencia y estructura de la proteína NS3 para identificar los posibles sitios de localización y expor-te nuclear, así como los posibles sitios de corte que se generarían en las proteínas del NPC
- ✓ Comparar la localización de la proteasa NS3 en células Huh7 infectadas con ZIKV y transfectadas con NS2B3 y NS2B3-S135A (proteasa inactiva)
- ✓ Analizar la participación de NS3 en la degradación y procesamiento del NPC

Estrategia experimental



Materiales y Métodos

Análisis *in silico* de NS3

La secuencia de las proteínas NS2B y NS3 de ZIKV, se obtuvo de la base de datos UniProt con número de acceso Q32ZE1; dicha secuencia se encuentra en la posición 1369-1498 para NS2B y 1499-2115 para NS3.

La búsqueda de motivos en la secuencia de las proteínas NS2B y NS3 de ZIKV se realizó con la herramienta ScanProsite de ExPASy Bioinformatics Resource Portal, dicha búsqueda se realizó con el escaneo de alta sensibilidad y sin exclusión de motivos con alta probabilidad de ocurrencia.

La obtención de las estructuras tridimensionales de las proteínas NS2B y NS3 de ZIKV se obtuvo en el Protein Data Bank (PDB), con el número de acceso 5GPI y para el caso de DENV con el número de acceso 3U1J. Las estructuras se manejaron con el software UCSF CHIMERA an Extensible Molecular Modeling System en su versión 1.13 para Windows 64bits. También en dicho software se realizó la superposición estructural de NS3 de ZIKV y DENV, mediante el comando Match.

El alineamiento de las secuencias de NS3 de flavivirus (DENV 4 cepa Dominica 1981, Filipinas H241; DENV 2 cepa Thailand 1997, New Guinea, Puerto Rico 1969; ZIKV cepa Mr766, Brasil 2015, MEX/InDRE/Sm/2016I; SPONV; WNV cepa NY-99 y JEV cepa S4-14) se realizó con la herramienta Multiple Sequence Alignment Clustal Omega.

La construcción del árbol filogenético de las secuencias de NS3 de flavivirus, se realizó con el software MEGA en su versión 7.0.26 for Windows, mediante el Test of phylogeny, mediante el método bootstrap con un número de 500 replicaciones.

La predicción de la secuencia de localización nuclear (NLS) de NS3 de ZIKV se realizó con el programa cNLS Mapper con un punto de corte de 5, en el sitio web WREGEX mediante la búsqueda del motivo TRG_NLS_Bipartite_1 y ScanProsite de ExPASy Bioinformatics Resource Portal.

Para la predicción de la secuencia de exporte nuclear (NES) de NS3 de ZIKV se realizó mediante la herramienta computacional LocNES, en el sitio web WREGEX mediante la búsqueda del motivo NES/CRM1 y el servidor NetNES 1.1.

La secuencia consenso para el corte en blancos de la proteasa NS3 de flavivirus, se obtuvo de MEROPS the Peptidase Database Release 12.0 del The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) con el número S07.001. Para la predicción de corte en Nup62, Nup98, Nup153 y TPR por NS3 de flavivirus se usó PMAP-CutDB Proteolytic Event Database y la predicción del tamaño de los residuos generados por el corte de NS3 en las diferentes nucleoporinas se realizó con la herramienta ProtParam de ExPASy Bioinformatics Resource Portal.

La obtención de las redes de interacción de Nup62, Nup98, Nup153 y TPR en *Homo sapiens*, se realizó en STRING DataBase versión 10.5.

Cultivo e infección de células Huh7 con ZIKV

ZIKV se propagó en cerebro de ratones CD1 neonatos, el título viral se calculó mediante ensayos de plaqueo en células Huh7. Las células Huh7 se crecieron a 37 °C con 5% de CO₂ en medio Advanced DMEM con glutamina 2 mM, penicilina (5 x 10⁴ U/ml), estreptomycin (50 µg/ml), 1 ml/L de fungizona y suero fetal bovino (SFB) al 5%.

La infección de células Huh7 con ZIKV, se realizó a una MOI de 3 (óptima para la infección) durante 2 h a 37 °C con 5% de CO₂ en medio Advanced DMEM 1% SFB. A continuación, se retiró el medio y se añadió medio DMEM con 5% SFB. La infección se permitió por 24 h.

Plásmido pcDNAplus NS2B3ZIKV

El plásmido pcDNAplus que contiene el inserto de NS2B3 (proteasa activa) y NS2B3-S135 (proteasa inactiva) de ZIKV (Figura 4), fue construido en el laboratorio del Dr. Jonathan Ball en la University of Nottingham, United Kingdom por los Drs.

José Humberto Oláis y el M. en C. Fernando Ruiz Jiménez, bajo la tutoría de la Dra. Rosa María Del Ángel.

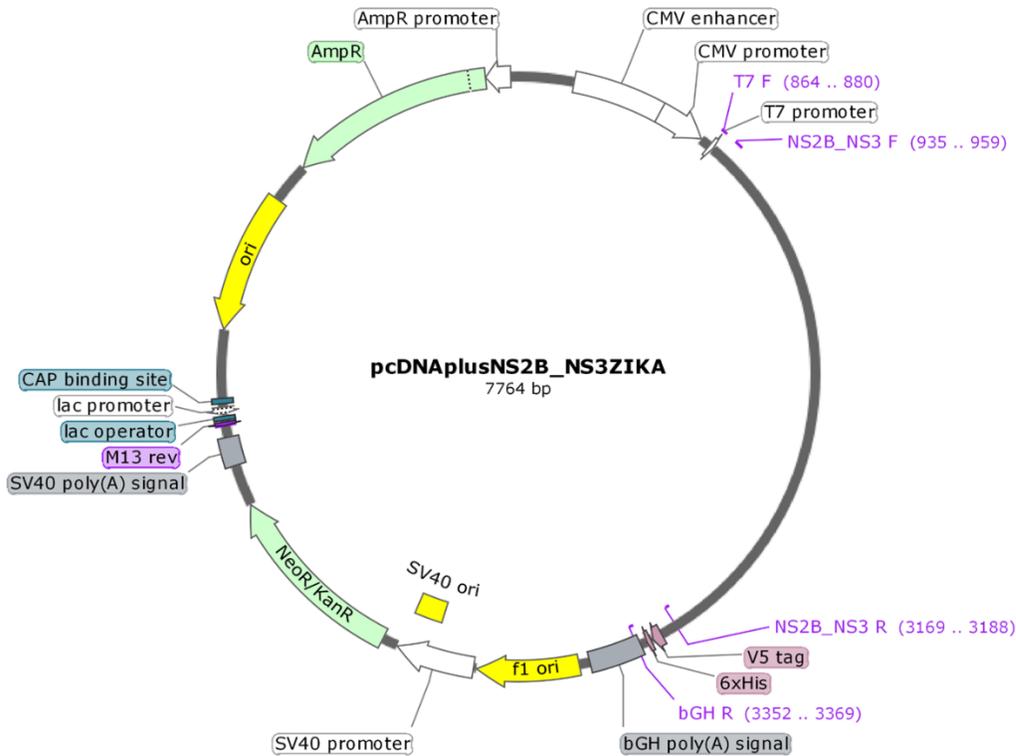


Figura 4: Plásmido pcDNAplus con inserto de NS2B3 o NS2B3-S135 de ZIKV: El inserto de NS2B3 o NS2B-S135, se encuentra en la posición 935-3188, validado por secuenciación. El plásmido contiene un promotor para procarionte con resistencia a ampicilina y un promotor de Citomegalovirus para eucarionte. Además, contiene una bandera de V5, útil para la localización de NS2B3 y NS2B-S135.

Propagación del plásmido con el inserto de NS2B3 y NS2B3-S135A de ZIKV

La propagación de los plásmidos se hizo en bacterias *E. coli* DH5 α competentes. Para ello, las bacterias se cultivaron en medio LB a 37 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5, a continuación, se colectaron por centrifugación (5 min a 4000 g a 4 °C), se resuspendieron en buffer TFB1 (RbCl 100 mM, 2H₂O MnCl₂ 50 mM, CH₃CO₂K 30 mM, CaCl₂ 10 mM, Glicerol 15%) en una proporción 1:3. Las bacterias se incubaron por 90 min en hielo, se colectaron las células por centrifugación (5 min a 4000 xg a 4 °C), y se resuspendieron en 4 ml de TFB2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂

75m M, Glicerol 15%). Se hicieron alícuotas de 100 µl y se guardaron a -70 °C hasta su uso.

Para la propagación del plásmido, se prepararon 70 ng/µl de plásmido y 900 µl de *E. coli* DH5α competentes, las bacterias se mantuvieron en hielo por 30 min, y a continuación se sometieron a un choque térmico a 42 °C por 30 seg y se mantuvieron en hielo por 5 min. Se les añadió 250 µl de medio LB sin antibiótico y se incubaron por 1 h a 37 °C en agitación. Finalmente, las bacterias se cultivaron en cajas Petri con Agar-LB y 100 µg/ml de Ampicilina, las cuales se incubaron por 24 h a 37 °C.

Una colonia de DH5α con el plásmido de NS2B3 ó NS2B3-S135A que tiene el gen de resistencia a Amp se inoculó en medio LB con 100 µg/ml de Amp, las bacterias se incubaron por 24 h, para su posterior lisis y extracción del plásmido con el kit Zyppy Plasmid Miniprep (ZYMO Research #D4020) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

Ensayo de liberación del inserto de NS2B3 y NS2B3-S135A

Para liberar el inserto correspondiente a la secuencia NS2B3 y NS2B3-S135A, los plásmidos de NS2B3 y NS2B3-S135A fueron digeridos con HindIII (FastDigest #FD0504 por 1 h a 37 °C en agitación, según las especificaciones del proveedor. Posteriormente, los fragmentos obtenidos se evaluaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 90 volts por 30 min.

Transfección de células Huh7 con el plásmido que codifica a NS2B-NS3

Las células Huh7 se crecieron a 37 °C con 5% de CO₂ en medio Advanced DMEM (con glutamina 2 mM, penicilina (5 x 10⁴ U/ml), estreptomycin (50 µg/ml), 1 ml/L de fungizona y SFB al 5%) a una confluencia del 70-80%.

Se incubó por 5 min a 37 °C una alícuota de 3 µl de lipofectamina 2000 (ThermoFisher Scientific # 11668027) en 50 µl de medio OptiMEM (ThermoFisher Scientific #31985070) y por separado una alícuota de 3 µg del plásmido en 50 µl de

medio OptiMEM (ThermoFisher Scientific #31985070). El contenido de la alícuota con el plásmido se mezcló al tubo con la lipofectamina y se incubó a 37 °C por 10 min. A continuación, se añadió 150 µl de medio OptiMEM y se incubó a 37 °C por 10 min.

Las células Huh7 se lavaron 2 veces con medio OptiMEM para eliminar el SFB y se les agregó la mezcla de lipofectamina y plásmido, las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. A las 6 h, se retiró el medio y se les agregó medio Advanced DMEM con 15% de SFB. La transfección se evaluó a las 48 h mediante Western Blot e Inmunofluorescencia.

Preparación de extractos de proteínas totales

La extracción de proteínas totales se realizó con buffer RIPA (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Tritón x-100, 0.1% Desoxicolato, 0.1% SDS y 140 mM NaCl). Células Huh7 infectadas con ZIKV o transfectadas con NS2B3 o NS2B3-S135A de ZIKV, se lavaron con PBS 1X. A continuación, se añadió 60 µl de RIPA (para una placa de 12 pozos) con inhibidores de proteasa por 5 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, las células se lisaron con una punta de pipeta y el extracto se recolectó en tubos eppendorf. Se incubó en hielo por 20 min; después se descartó el DNA, mediante precipitación dando un spin por 5 seg, quedando en el sobrenadante las proteínas. El extracto se almacenó a 4 °C hasta su uso y las proteínas se cuantificaron con Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific #23225), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El extracto total de proteínas de células transfectadas con NS2B3, NS2B-S135 e infectadas con ZIKV, fueron separadas por peso molecular mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con una concentración de 7.5% de acrilamida, con el equipo de electroforesis (Bio-Rad modelo Mini PROTEAN Tetra Cell) y peines de 1.5 mm de grosor con 10 pozos. La electroforesis se realizó a 120 volts. A cada pozo se le agregó 30 µg de proteína.

Transferencia a membrana de nitrocelulosa

Al término de la electroforesis, se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa con poro de 0.2 μm por 1 h 10 min a 100 volts en el equipo Bio-Rad modelo Mini Trans-Blot Cell.

Western Blot

La técnica de Western Blot se realizó bloqueando la membrana de nitrocelulosa con leche descremada al 10% en PBS 1X-Tritón X-100 0.5% durante 1 h a TA. Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario diluido en leche descremada al 5%, durante toda la noche a 4 °C en las siguientes concentraciones:

Ab	Hospedero	Dilución	Fabricante	# catalogo
Anti-Nup98	ratón	1:1000	Santa Cruz	SC-74578
Anti-Nup62	conejo	1:5000	Santa Cruz	SC-25523
Anti-Nup153	ratón	1:6000	Abcam	AB96462
Anti-TPR	ratón	1:1000	Santa Cruz	SC-271317
Anti-NS3 DENV	conejo	1:1000	GeneTex	GTX124252

Después, se lavó la membrana 5 veces con PBS 1X-Tritón X-100 0.5% por 10 min y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón) acoplado a HRP durante 2 h a TA en una dilución de 1:5000 en PBS 1X-Tritón X-100 0.5%. Finalmente se lavó la membrana 5 veces más. El revelado se llevó a cabo con SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate kit (ThermoFisher Scientific #34095).

Inmunofluorescencia

Las células Huh7 se cultivaron en placas de 24 pozos sobre cubre objetos circulares hasta alcanzar una confluencia de 70-80% para ser transfectadas o infectadas con ZIKV. Las células se fijaron con PFA al 4% durante 20 min a 4 °C, a continuación, se permeabilizaron y se bloquearon con 0.2% saponina y 1% SFB, diluido en PBS 1X durante 20 min en agitación y se lavó con 0.2% saponina, 1% SFB-PBS 1X. El anticuerpo primario diluido en 0.2% saponina, 1% SFB-PBS 1X, durante toda la noche a 4 °C en las siguientes concentraciones:

Ab	Hospedero	Dilución	Fabricante	# catalogo
Anti-Nup98	ratón	1:100	Santa Cruz	SC-74578
Anti-Nup62	conejo	1:300	Santa Cruz	SC-25523
Anti-Nup153	ratón	1:100	Abcam	AB96462
Anti-TPR	ratón	1:100	Santa Cruz	SC-271317
Anti-NS3 DENV	conejo	1:200	GeneTex	GTX124252
Anti-V5	ratón	1:500		

Las células se lavaron 3 veces con 0.2% saponina, 1% SFB-PBS 1X. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa 488 anti-ratón 1:1000 y Alexa 594 anti-conejo 1:200) por 2 h en 0.2% saponina, 1% SFB-PBS 1X a TA y se lavaron 3 veces más. Después se incubaron con DAPI en una concentración de 1:1000 en PBS 1X por 10 min.

Las células se lavaron 3 veces con 50 mM de NH₄Cl en PBS 1X y una más con agua destilada para eliminar el exceso de sales. Las preparaciones se montaron con VECTASHIELD Mounting Medium y se almacenaron a 4 °C, hasta su observación en el microscopio confocal Leica TCS SP8. Las imágenes obtenidas bajo el microscopio, se procesaron con el software Leica Application Suite X Core Offline version 3.3.0 for Windows 10.

Resultados

Análisis *in silico* de NS3

Descripción de la estructura y características de NS2B y NS3 de ZIKV

Con el fin de conocer los motivos que contienen las proteínas virales NS2B y NS3 se realizaron diversos ensayos *in silico*. Se ingresó a la base de datos de UniProtKB con el número de acceso Q32ZE1, para obtener el genoma completo de ZIKV. Las secuencias de NS2B y NS3 se analizaron con la herramienta ScanProsite de ExPASy. Esta herramienta mostró que la proteína NS3 tiene un dominio helicasa de 330 aa, en el extremo carboxilo y un dominio serina proteasa de 180 aa (Figura 5).

El dominio de la serina proteasa es de tipo tripsina, es decir, que la proteasa tiene preferencias por arginina y lisina. Además, tiene una tríada catalítica H51, D75 y S135; se ha descrito que la mutación en este último aminoácido por una alanina (S135A) elimina la acción proteasa.

Por su parte la NS2B con un tamaño de 130 aa, interactúa con la NS3 para plegarla correctamente y que aumente su afinidad por su sustrato. Para ello son necesarios 40 aa.

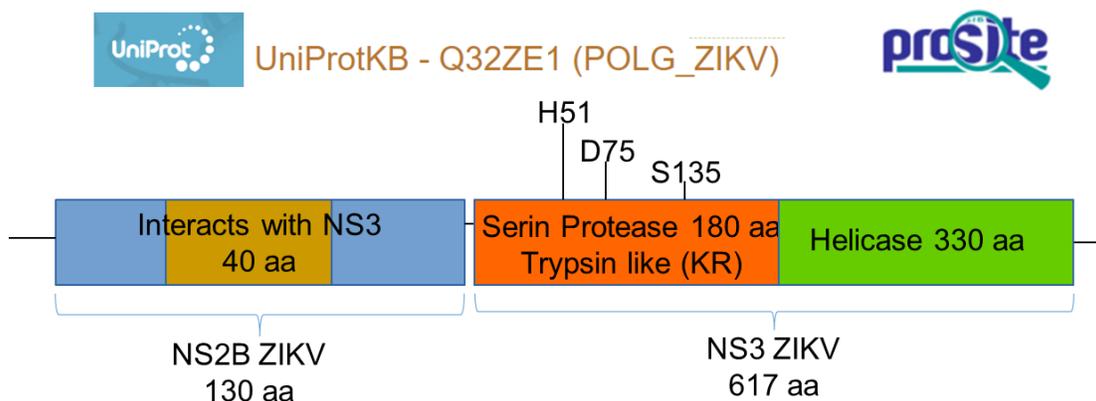


Figura 5: Análisis de motivos de las secuencias de NS2B y NS3 de ZIKV. El análisis se realizó con la herramienta ScanProsite de ExPASy Bioinformatics Resource Portal. Las secuencias fueron obtenidas con el número de acceso Q32ZE1 en UniProtKB.

Las características estructurales de las proteínas NS2B y NS3 (Figura 6), se analizaron con el software UCSF CHIMERA an Extensible Molecular Modeling System. Para ello, la estructura cristalina de dichas proteínas se obtuvo del Protein Data Bank con el número de acceso 5GPI. Con el software CHIMERA se eliminaron las cadenas que no eran de nuestro interés y se marcó la NS3 de color púrpura, dicha proteína tiene 2 láminas β -barriles, 4 láminas β -plegadas, 2 α hélice y 8 asas. Por su parte la NS2B marcada en color verde tiene 4 láminas β -plegadas y 1 asa. Esta se pliega a la NS3 por el lado contrario a la triada catalítica (representada en color anaranjado).



Figura 6: Estructura cristalina de las proteínas NS2B y NS3 de ZIKV. La estructura se obtuvo del Protein Data Bank (5GPI). La NS2B se marcó en color verde, la NS3 en color púrpura y su triada catalítica en color anaranjado.

Comparación de la triada catalítica de NS3 de ZIKV con otros flavivirus

Con el fin de conocer si la NS3 de diferentes flavivirus podría tener blancos similares a los de la NS3 de ZIKV, se realizó un alineamiento de diferentes secuencias de NS3 de DENV, ZIKV, SPONV, WNV y JEV. Se observó que la triada catalítica de la proteasa (H51, D75 y S135) esta conservada en los diferentes flavivirus (Figura 7), por lo que los blancos de las diferentes NS3 de flavivirus podrían ser similares.

Sequence alignment

Consensus key (see documentation for details)

- * - single, fully conserved residue
- : - conservation of strong groups
- . - conservation of weak groups
- no consensus

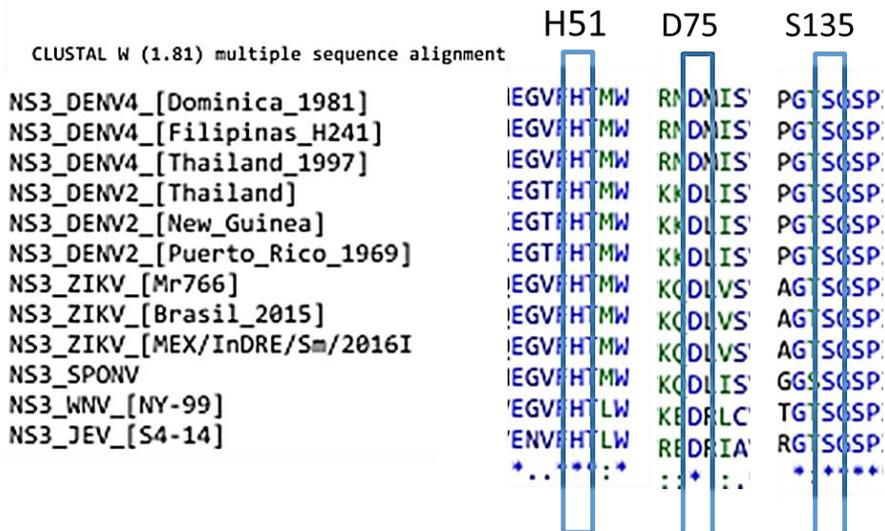


Figura 7: Alineamiento de la triada catalítica de NS3 de diferentes flavivirus. El alineamiento se realizó con la herramienta Multiple Sequence Alignment Clustal Omega.

Además, se construyó un árbol filogenético con las secuencias de NS3 de los diferentes flavivirus (Figura 8), con el software MEGA. Se puede observar que las diferentes cepas de ZIKV se encuentran en una sola rama del árbol, lo mismo pasa con DENV, también se puede observar que el SPONV está más relacionado a ZIKV que otros flavivirus. Por su parte DENV se encuentra agrupado en otra rama del árbol.

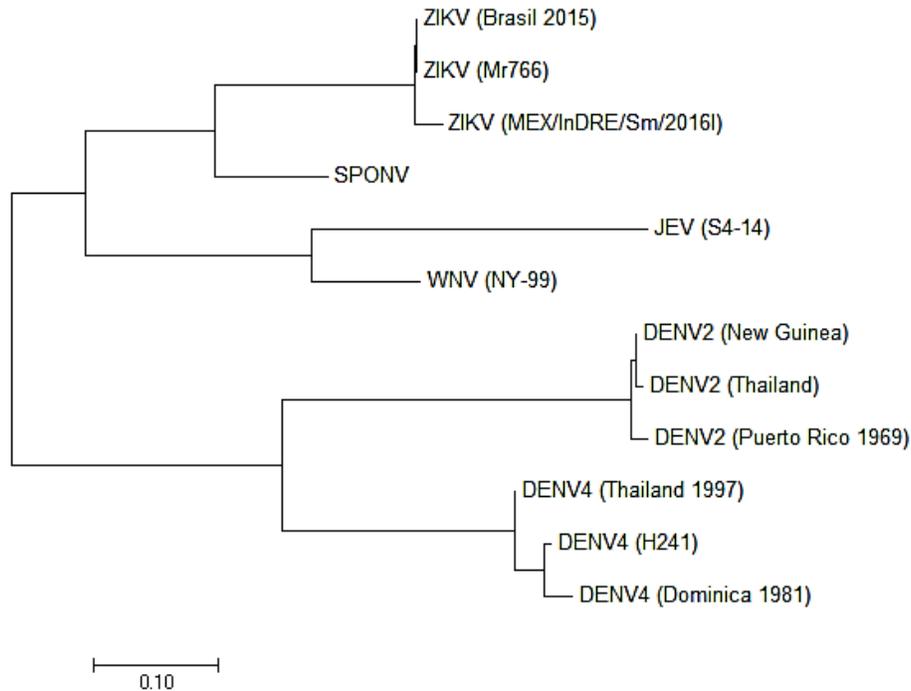


Figura 8: Árbol filogenético basado en la secuencia de NS3 de diferentes flavivirus. La construcción de este árbol filogenético se realizó con el software MEGA, bajo el método de Bootstrap con 500 replicaciones.

Comparación de la estructura de NS3 de ZIKV y DENV

En el laboratorio se conocía que algunas de las nucleoporinas procesadas por NS3 de ZIKV también eran procesadas por el NS3 de DENV. Para conocer si las estructuras de ambas NS3 eran similares y poder comparar sus blancos de acción, se decidió comparar la estructura de NS3 de ZIKV y DENV. Para ello se obtuvo la estructura cristalina de ambas proteínas y con el software UCSF CHIMERA an Extensible Molecular Modeling System, se realizó la superposición estructural.

La NS3 de ZIKV (Figura 9a) tiene 2 láminas β -barriles, 4 láminas β -plegadas, 2 α hélice y 8 asas, por su parte la NS3 de DENV (Figura 9b) tiene 2 láminas β -barriles, 6 láminas β -plegadas, 1 α -hélice y 9 asas. Al realizar el *Match* (Figura 9c) se puede observar que estructuralmente ambas proteínas son similares, y al analizar su secuencia de aminoácidos se obtiene un 66% de similitud entre éstas.

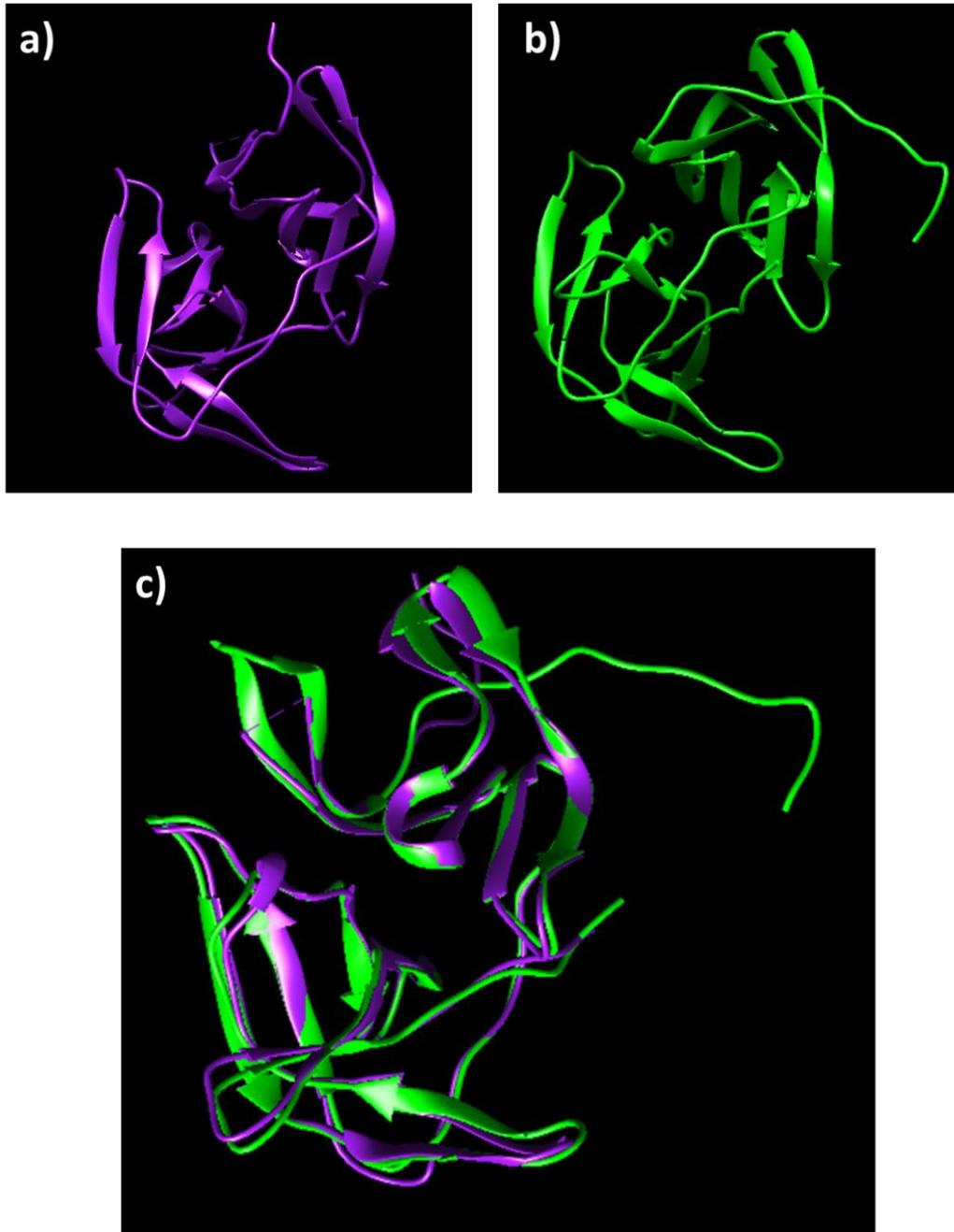


Figura 9. Superposición estructural de NS3 de ZIKV y DENV. a) NS3 de ZIKV, b) NS3 de DENV, c) Superposición de NS3 de ZIKV y DENV, en purpura se observa la NS3 de ZIKV y en verde la NS3 de DENV. Dicha superposición se realizó con el software UCSF CHIMERA an Extensible Molecular Modeling System, con el comando Match.

Predicción de sitios de localización (NLS) en NS3 de ZIKV

En el laboratorio se había observado que NS3 de DENV puede encontrarse en núcleo, ante esto, decidimos buscar secuencias de localización y exporte nuclear en la proteína NS3 de ZIKV.

Para saber si NS3 de ZIKV tiene secuencias putativas de localización nuclear (NLS), se analizó su secuencia con el programa cNLS Mapper, el sitio web WREGEX y con la herramienta ScanProsite de ExPASy.

cNLS Mapper predijo una secuencia monopartita a partir de la posición 210 con un valor de corte 5 (Tabla 1). WREGEX, ScanProsite y cNLS Mapper predijeron en particular una misma secuencia bipartita a partir de la posición 202. Además, WREGEX predijo una secuencia bipartita a partir de la posición 583 y 169.

Tabla1: Secuencia de localización nuclear predichas para NS3 de ZIKV.

Tipo de NLS	Base de datos	Secuencia predicha
Monopartita	cNLS Mapper	210 REAIKKRLRTV
Bipartita	cNLS Mapper, Wregex y ScanProsite	202 RRVLPEIVREAIKKRLR
	Wregex	583 KYGEKRVLKPRWMDARVCSDHA ALKSFKE
	Wregex	169 KREEETPVECFEPSMLKKKQL

Además, las secuencias de NS3 de diferentes flavivirus fueron alineadas (Figura 10) y se observó que las NLS predichas, estaban conservadas en los diferentes flavivirus, por lo que también podrían ser NLS para estos flavivirus.

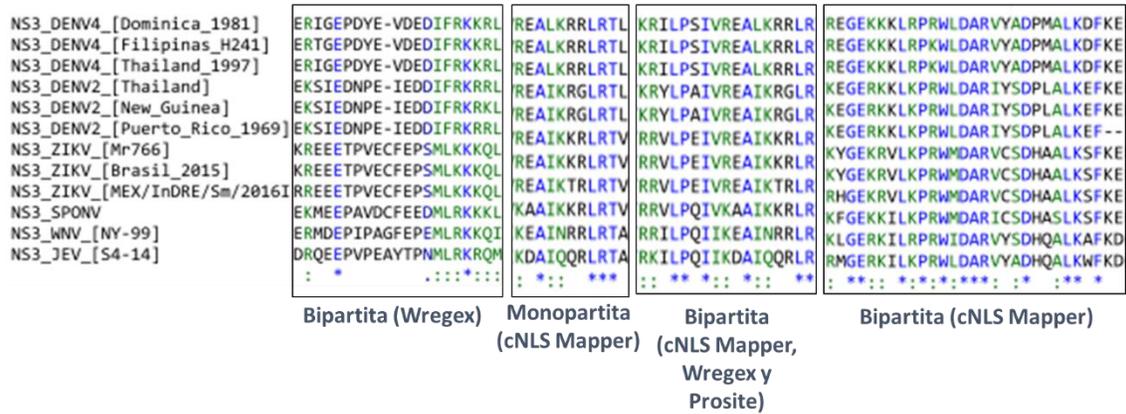


Figura 10: Alineamiento de secuencias de localización nuclear de NS3 en diferentes flavivirus. El alineamiento se realizó con la herramienta Multiple Sequence Alignment Clustal Omega.

Predicción de secuencias de exporte nuclear (NES) en NS3 de ZIKV

La secuencia clásica de la vía exportina CRM1, está conformada por secuencias ricas en leucina, separadas por aminoácidos no polares con una extensión de entre 8 – 15 aminoácidos.

La predicción de secuencias de exporte nuclear (NES) se realizó con la herramienta LocNES, el sitio web WREGEX y mediante el servidor NetNES (Tabla 2). Para todos los casos se predijo una secuencia a partir de la posición 86, con diferente porcentaje de probabilidad de que fuera un NES.

Tabla 2. Secuencias de exporte nuclear predichas para NS3 de ZIKV.

NES	Base de datos y % de probabilidad favorable para NES	Secuencia predicha
NES clásico vía CRM1	LocNES 60%	86 DAAWDG L SEVQ LL AV
	NetNES 83%	85 L DAAWDG L SEVQ LL
	Wregex 73.5%	90 DG L SEVQ LL AVPPGE

Para este caso también las secuencias de NS3 de diferentes flavivirus fueron alineadas (Figura 11) y se observó que las leucinas de las NES predichas, también estaban altamente conservadas en los diferentes flavivirus, por lo que podrían también ser NES para todos ellos.

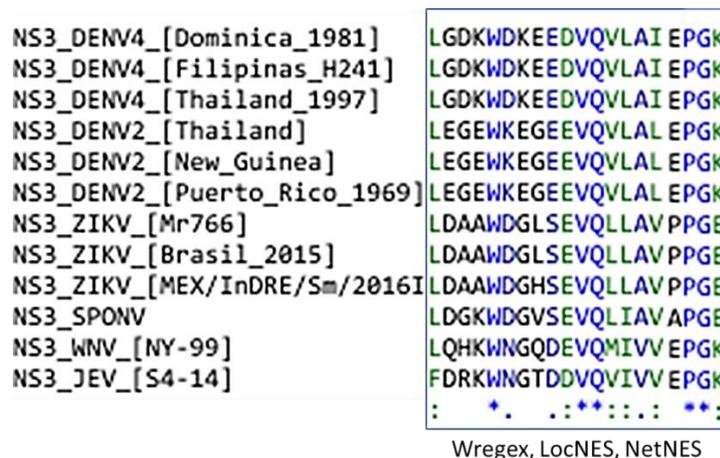


Figura 11: Alineamiento de secuencias de exporte nuclear de NS3 en diferentes flavivirus. El alineamiento se realizó con la herramienta Multiple Sequence Alignment Clustal Omega.

Predicción del procesamiento de nucleoporinas por la NS3 de flavivirus

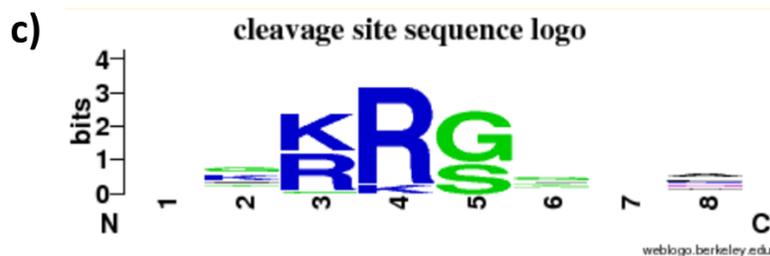
Para obtener la secuencia óptima de corte de NS3 a sus proteínas blanco, se decidió usar la base de datos de MEROPS.

En dicha base de datos con el número de acceso S07.001 se encuentran los sustratos óptimos para la NS3 de diferentes flavivirus (DENV 1-4 y YFV), el WebLogo construido a partir del alineamiento de estos sustratos y la secuencia consenso de corte (Figura 12).

a)

Flavivirus	Sustrato optimo	Referencia
DENV 1	xxxx/SDSN	Li et al., 2005
DENV 2	xxxx/SGSG	Li et al., 2005
DENV 3	xxxx/SDSG	Li et al., 2005
DENV 4	xxxx/SGSG	Li et al., 2005
YFV	xGKK/TLRx	Alves et al., 2007
YFV	RRRR/SAGx	Nigomrattanakit et al., 2006
DENV 1	nKRR	Li et al., 2005
DENV 4	LKRR	Li et al., 2005
DENV 2	nKRR	Li et al., 2005

MEROPS



c) -/gk/KR/R|Gs/g/-/a basado en 21 cortes

Figura 12. Secuencia consenso de corte en los blancos de NS3 de flavivirus. Obtenido de MEROPS the Peptidase Database Release 12.0 del The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) con el número S07.001.

A pesar de que esta secuencia esta predicha para otros flavivirus diferentes a ZIKV, dicha secuencia de corte podría ser similar para el caso de NS3 de ZIKV, ya que la estructura y aminoácidos de NS3 son similares entre estos flavivirus.

Para conocer si la NS3 de flavivirus puede cortar a Nup62, Nup98, Nup153 y TPR, se introdujeron dichos sustratos y el código de MEROPS de la NS3 a la base de datos CutDB. Dicha base de datos predijo 1 sitio de corte para Nup62 a partir de la posición 508 de la proteína, 3 sitios de corte para Nup98 a partir de las posiciones 593, 1301 y 1424, 1 sitio para Nup153 a partir de la posición 1471 y sitio de corte para TPR a partir de la posición 1021(Tabla 3).

Con base en estos sitios de corte en las nucleoporinas, se calculó el tamaño de los posibles fragmentos generados por la proteasa con la herramienta ProtParam de ExPASy (Tabla 3).

Tabla 3. Sitios de cortes predichos para nucleoporinas por la proteasa NS3 de flavivirus.

Nucleoporina	Secuencias de corte predichas para las Nups	Posibles tamaños de los residuos
Nup62 (522 aa)	508 RR/KEQERSFR	60.7 kDa, 1.5 kDa
Nup98 (1817 aa)	593 KK/SIKKL 1301 RRR/AFSRWL 1424 KR/SLAIH	32.8 kDa 38.2 kDa 6.6 kDa 21.2 kDa
Nup153 (1475 aa)	1471 RRR/K	153.8 kDa
TPR (2363 aa)	1021 KRR/AIESMEQQL	118.7 kDa, 148.5 kDa

Localización de NS3 en células transfectadas e infectadas con ZIKV

Para poder analizar la localización de NS3 se infectaron células Huh7 con ZIKV o se transfectaron con la proteasa viral activa o inactiva.

Expresión de NS3 de ZIKV en células Huh7 y células transfectadas con NS3

Para los ensayos de transfección, inicialmente se determinó mediante restricción enzimática con la enzima HindIII, la presencia del inserto de NS2B3 o de NS2B3-S135A en el plásmido pcDNAplus. Esta enzima de restricción reconoce la secuencia palindrómica 5'...A || AGCTT... 3', 3'...TTCGA || A... 5' para ejercer el corte.

Se calcularon los residuos generados por la enzima sobre los plásmidos y se predijeron dos sitios de corte en la posición 902 y 2898 (Figura 13a), que generan un fragmento de aproximadamente 2 kb que corresponde al inserto y un fragmento de aproximadamente 5.7 kb que corresponde al plásmido.

Se realizó la digestión enzimática de los plásmidos obtenidos de dos colonias de *E. coli* DH5 α transformadas (Figura 13b). Se corrieron los plásmidos completos y los residuos de la digestión en un gel de agarosa (carril 1, 2, 3 y 4). Se obtuvo una banda de 7.7 kb para los plásmidos sin acción enzimática y dos fragmentos después de la acción enzimática de aproximadamente 2 kb y 5.7 kb, que era lo esperado. Con esto se confirmó que los insertos se encontraban dentro de los plásmidos.

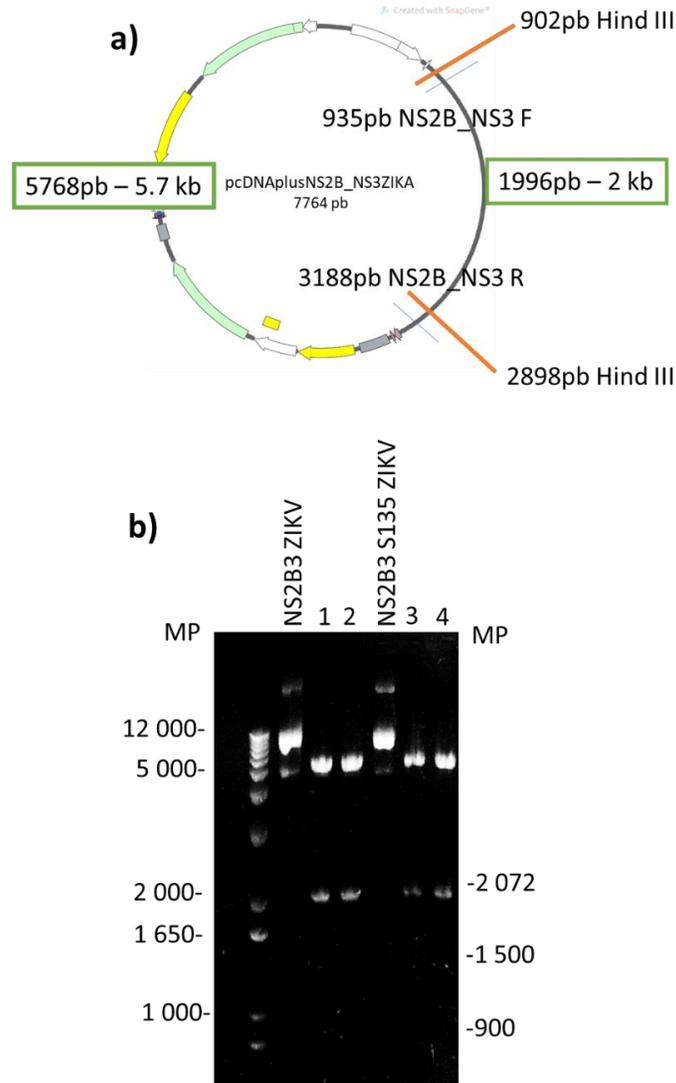


Figura 13. Ensayo de liberación del inserto por acción enzimática en plásmidos con el inserto de NS2B3 o NS2B3-S135. La liberación del inserto se realizó con la enzima de restricción HindIII.

Una vez que se sabía que los insertos estaban presentes en los plásmidos, se transfectaron células Huh7 con lipofectamina y la expresión de NS3 se validó por Western Blot (Figura 14).

Las células transfectadas se lisaron a las 48 h post-transfección, a la par también se infectaron células con ZIKV como control positivo, para evaluar la presencia de NS3 en las células. Como se observa en la figura 14 en el control negativo (Mock) no se observa la presencia de NS3 (68 kDa). Sin embargo, en los carriles con

células infectadas con ZIKV y transfectadas con NS3, se observa claramente la presencia de NS3, con una cantidad similar en los tres casos. Con este resultado se validó la transfección de la NS3 en células Huh7.

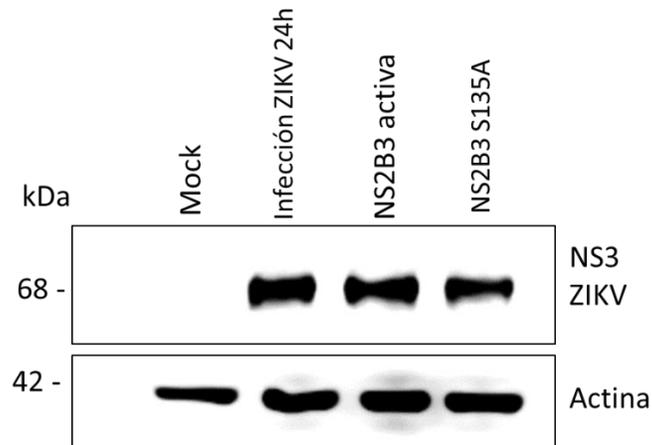


Figura 14. Western Blot de extracto de células Huh7 infectadas con ZIKV y transfectadas con NS3 para validar la presencia de NS3. Los extractos proteicos (30 µg) obtenidos de células Huh7 infectadas con ZIKV o transfectadas con la proteína NS2B3 o NS2B3S135A por 24 y 48 h respectivamente se sometieron a análisis por Western-Blot usando anticuerpos anti-NS3. El anticuerpo anti-actina se usó como control de carga.

Localización de NS3 de ZIKV durante la infección y transfección de células Huh7

Una vez que se validó la transfección de NS3 por Western Blot, se comparó la ubicación celular de la NS3 en células Huh7 infectadas con ZIKV y transfectadas con NS2B3 o NS2B3-S135A (Figura 15).

En el caso de las células infectadas por 24 h con ZIKV, se puede observar que NS3 tiene una distribución mayoritariamente en citoplasma, pero también perinuclear. En las células transfectadas con NS2B3 y NS2B3-S135A, se puede observar a la NS3 distribuida en el citoplasma y también en el núcleo.

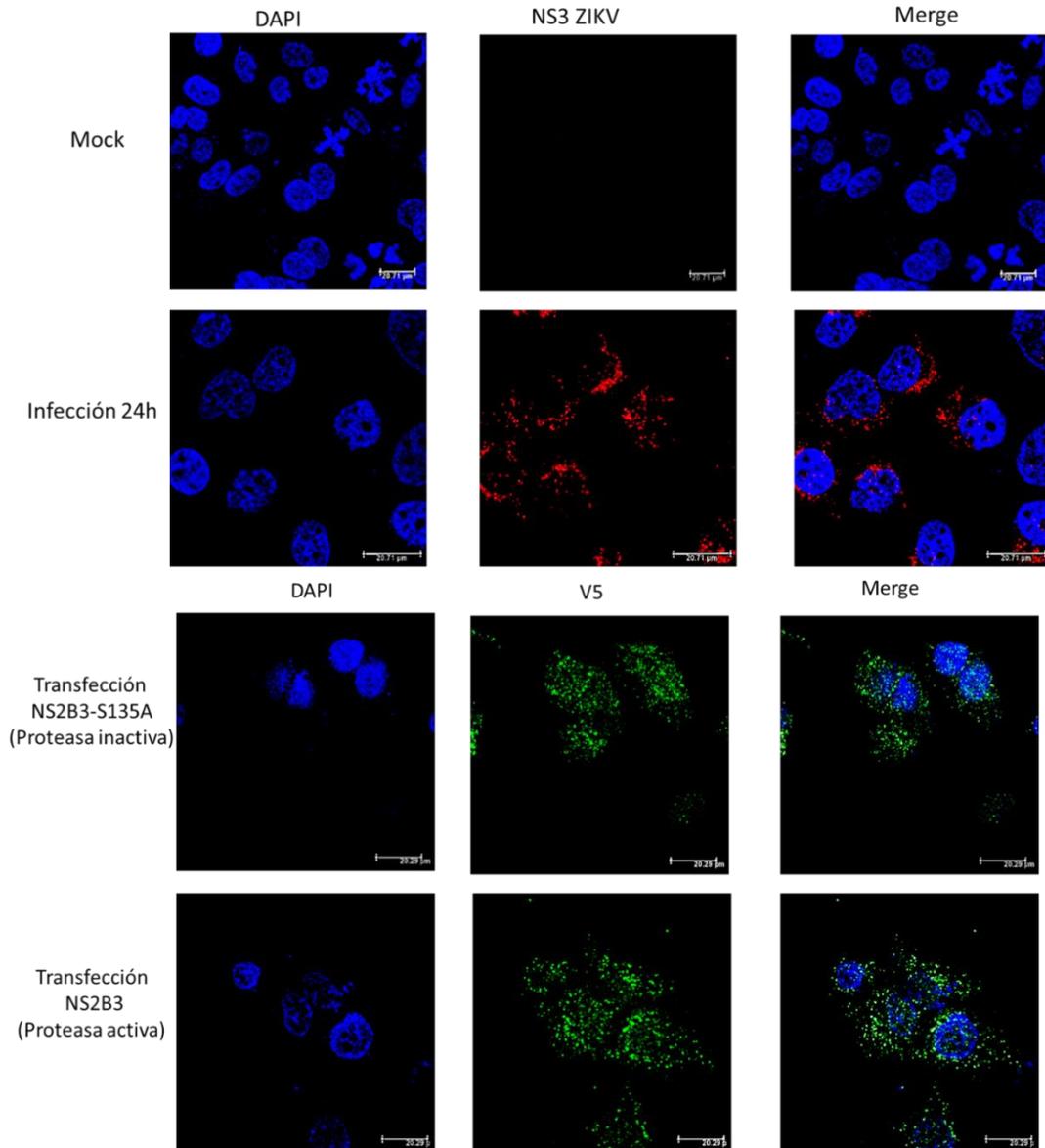


Figura 15. Localización celular de NS3 en células infectadas con ZIKV y transfectadas con NS2B3-S135A y NS2B3. Las células Huh7 infectadas con ZIKV o transfectadas con la proteína NS2B3 o NS2B3S135A por 24 y 48 h respectivamente se analizaron mediante microscopía confocal usando anticuerpos anti-NS3 y anti-V5. El núcleo se contratiñó con DAPI.

Análisis de la integridad del poro nuclear y nucleoporinas durante la infección con ZIKV y acción de NS3

Una vez que se establecieron las condiciones ideales para transfectar las células con los plásmidos de NS2B3 y NS2B3-S135A, se evaluó la integridad de las

nucleoporinas Nup62, Nup98, Nup153 y TPR, en células transfectadas con NS3 y en células infectadas con ZIKV.

Integridad de Nup62 durante la infección con ZIKV y transfección de NS3 en células Huh7

La localización subcelular de Nup62 en condiciones normales, es nuclear y específicamente se encuentra en el anillo central y el anillo citoplasmático del NPC. Con el fin de evaluar la integridad de Nup62 en células infectadas con ZIKV (Figura 16) las células se analizaron por inmunofluorescencia indirecta mediante microscopía confocal. Como puede observarse, al igual que las células control, la Nup 62 tiene una localización nucleoplásmica, la cual no se ve alterada en las células infectadas (con tinción para la proteína E en verde), sugiriendo que Nup 62 no se procesa durante la infección con ZIKV.

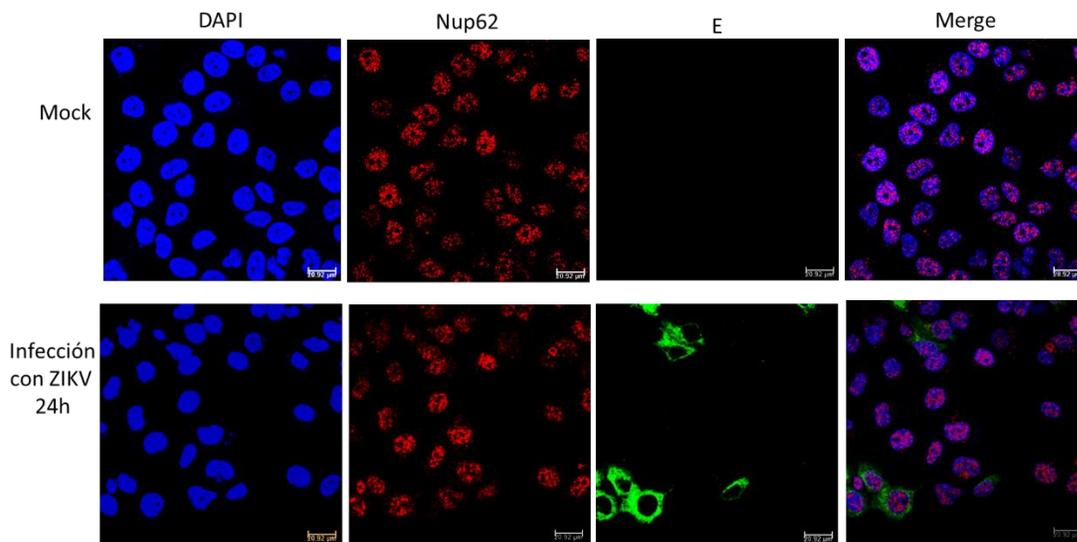


Figura 16. Inmunofluorescencia indirecta de Nup62 en células Huh7 infectadas con ZIKV y el grupo control. Células Huh7 se infectaron con ZIKV durante 24 h y la integridad de la NUP62 se evaluó mediante inmunofluorescencia utilizando un anti-NUP62. La marca de color verde indica la presencia de la proteína E viral.

Aunque no se observaron cambios en la integridad de Nup62 en células control e infectadas con ZIKV por inmunofluorescencia, se evaluó la integridad de Nup62 mediante Western Blot tanto en células infectadas con ZIKV como en células transfectadas con NS2B3 y NS2B3-S135A.

En la figura 17a se muestra el Western Blot de Nup62 en células no infectadas, infectadas con ZIKV y transfectadas con la proteasa inactiva (NS2B3-S135A) y la proteasa activa (NS2B3). Como puede verse, no hubo cambios en la integridad de esta nucleoporina en los diferentes grupos, y no hay diferencias significativas en la intensidad de la banda entre los grupos, confirmando la observación previa de que la integridad de Nup-62 no se altera en células infectadas con ZIKV (Figura 17b). Aunque la base de datos CutDB predijo un sitio de corte en la posición 508 de Nup62 (Figura 17c), no se observaron cambios en el peso molecular de la proteína ni en su cantidad en comparación con células no infectadas.

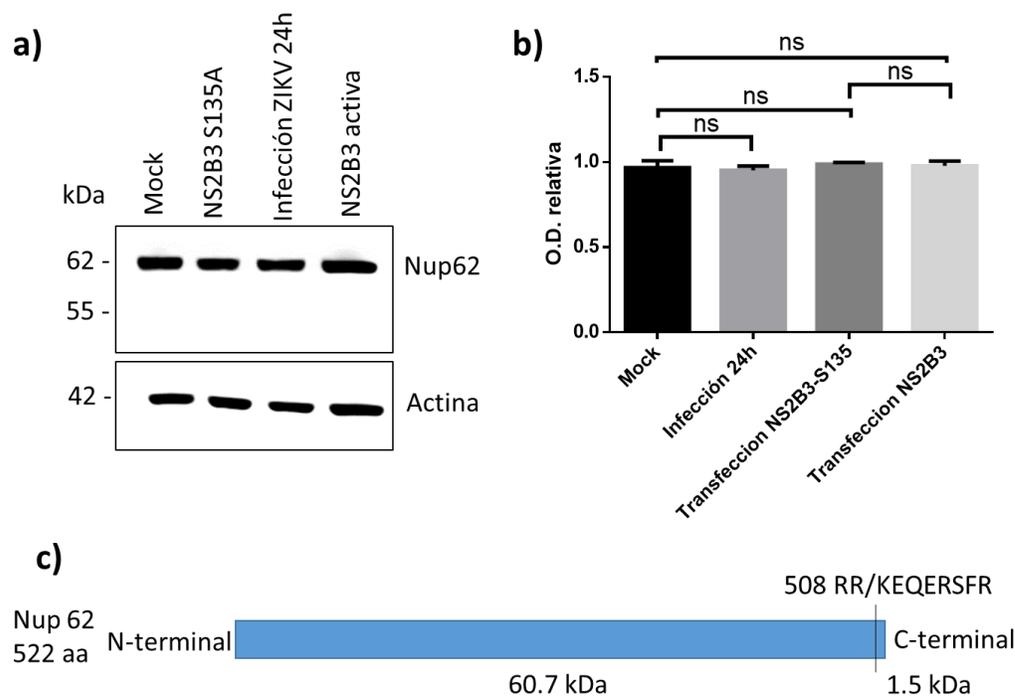


Figura 17. Western Blot de Nup62 en células infectadas con ZIKV y transfectadas con NS2B3 y NS2B3-S135A. Extractos proteicos de células Huh7 infectadas con ZIKV o transfectadas con la proteína NS2B3 o NS2B3S135A por 24 y 48 h respectivamente se sometieron a análisis por Western-blot (a) usando anticuerpos anti-Nup 62. b) ANOVA one way de la O.D. relativa del estado de Nup62 en los diferentes grupos ($p < 0.05$), c) mapa del corte de NS3 de flavivirus en la Nup62, predicho por CutDB.

Integridad de Nup98 durante la infección con ZIKV y transfección de NS3 en células Huh7

La literatura menciona que la localización celular de Nup98 es perinuclear y específicamente se encuentra en el anillo central y el anillo citoplasmático del NPC.

Por tanto, se evaluó la integridad de Nup98 en células infectadas con ZIKV por inmunofluorescencia indirecta mediante microscopía confocal (Figura 18).

Mientras que en las células no infectadas la Nup98 se encuentra claramente alrededor del núcleo, en las células infectadas su distribución alrededor del núcleo es difusa.

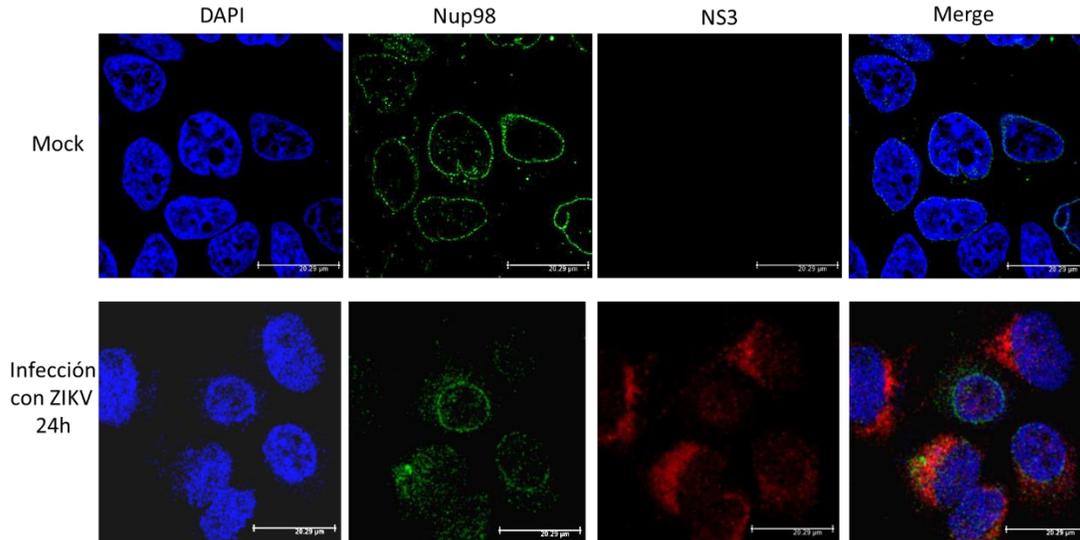


Figura 18. Inmunofluorescencia indirecta de Nup98 en células Huh7 infectadas con ZIKV y el grupo control. Células HUH7 se infectaron con ZIKV durante 24 h y la integridad de la NUP98 se evaluó mediante inmunofluorescencia utilizando un anti-NUP98 y la proteína viral NS3.

La reducción de la cantidad de ésta proteína sugiere que ésta está siendo degradada. Estos datos se corroboraron por Western Blot (Figura 19a) en donde se observó la reducción de la banda de Nup98 en las células infectadas con ZIKV y en las transfectadas con la proteasa activa pero no así en presencia de la proteasa

inactiva. Este resultado fue cuantificado mediante la O.D. relativa de la Nup98 (Figura 19b) con respecto a la de la actina, encontrando diferencias significativas en los grupos de células infectadas y transfectadas con la proteasa activa en comparación con las células control o transfectadas con la proteasa mutada. La base de datos CutDB predijo 3 sitios de corte por la NS3 de flavivirus en la posición 593, 1301 y 1424 de la Nup98 (Figura 19c), que generan tres productos de 32.8, 38.2 6.6 y 21.2 kDa; sin embargo, no se observaron los fragmentos calculados para estos cortes mediante Western Blot.

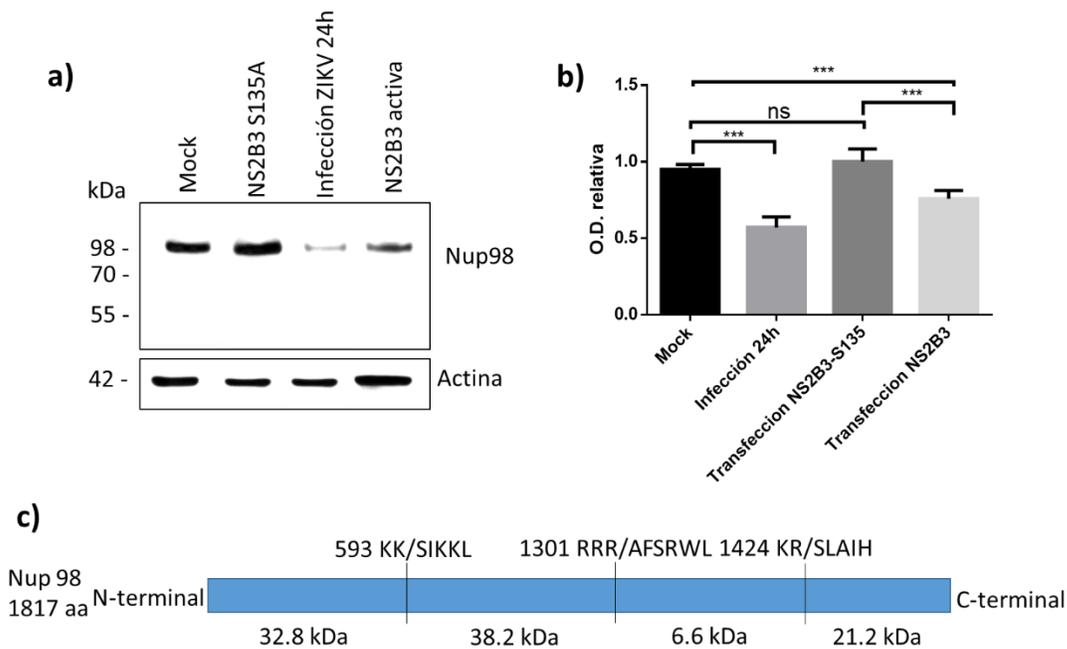


Figura 19. Western Blot de Nup98 en células infectadas con ZIKV y transfectadas con NS2B3 y NS2B3-S135A. Extractos proteicos de células Huh7 infectadas con ZIKV o transfectadas con la proteína NS2B3 o NS2B3S135A por 24 y 48 h respectivamente se sometieron a análisis por Western-blot (a) usando anticuerpos anti-Nup98, b) ANOVA one way de la O.D. relativa del estado de Nup98 en los diferentes grupos ($p < 0.05$), c) mapa de los cortes de NS3 de flavivirus en la Nup98, cortes predichos por CutDB.

Integridad de Nup153 durante la infección con ZIKV y transfección de NS3 en células Huh7

La literatura menciona que la localización subcelular de Nup153 es perinuclear y específicamente se encuentra en la canastilla nuclear del NPC.

Dada la importancia de la Nup 153 en el transporte núcleo-citoplasma, la integridad de Nup153 en células infectadas con ZIKV fue evaluada por inmunofluorescencia indirecta mediante microscopía confocal (Figura 20). Se observó que en células no infectadas la tinción de la Nup153 se encuentra alrededor del núcleo tiñendo nítidamente un arillo perinuclear. Sin embargo, en las células infectadas la tinción alrededor del núcleo es menos intensa, sugiriendo que hay una reducción de la presencia de la proteína en esta región.

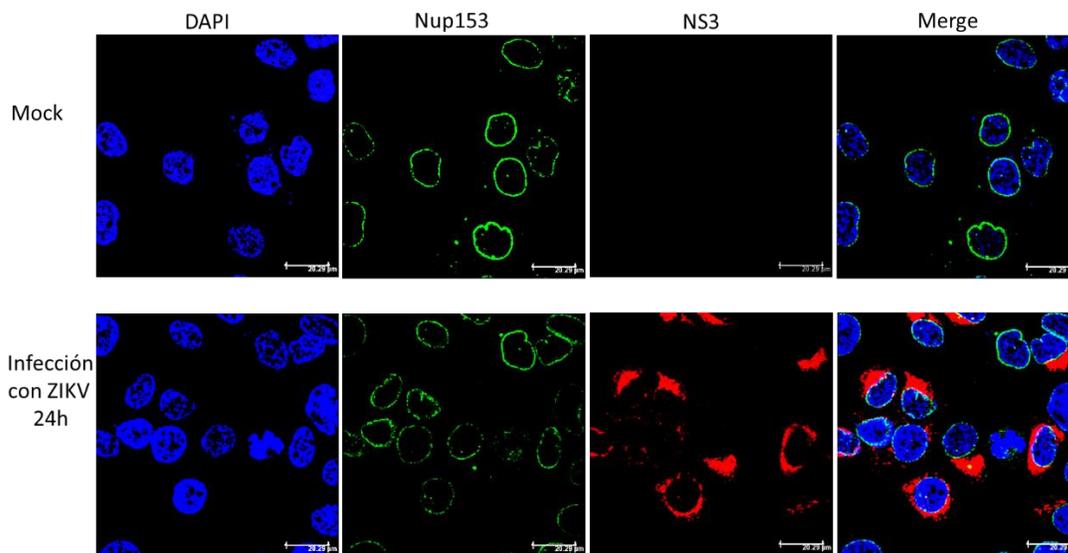


Figura 20. Inmunofluorescencia indirecta de Nup153 en células Huh7 infectadas con ZIKV y el grupo control. Células HUH7 se infectaron con ZIKV durante 24 h y la integridad de la NUP153 se evaluó mediante inmunofluorescencia utilizando un anti-NUP153 y la proteína viral NS3.

Esta posibilidad se confirmó mediante Western Blot (Figura 21a), pues en las células infectadas se observó una reducción en la cantidad de proteína al igual que en las células transfectadas con la proteasa activa. Dichas alteraciones no fueron observadas en el grupo control y en las células transfectadas con la proteasa

inactiva. Las diferencias entre ambos grupos se confirmaron mediante la cuantificación de la O.D. relativa de la Nup153 (Figura 21b), encontrando diferencias significativas en los grupos de células infectadas y transfectadas con la proteasa activa. La base de datos CutDB predijo 1 sitio de corte por la NS3 de flavivirus en la posición 1471 de Nup153 (Figura 21c). En este caso tampoco se observaron fragmentos de la Nup153 mediante Western Blot, pero si una reducción de la cantidad total de proteína.

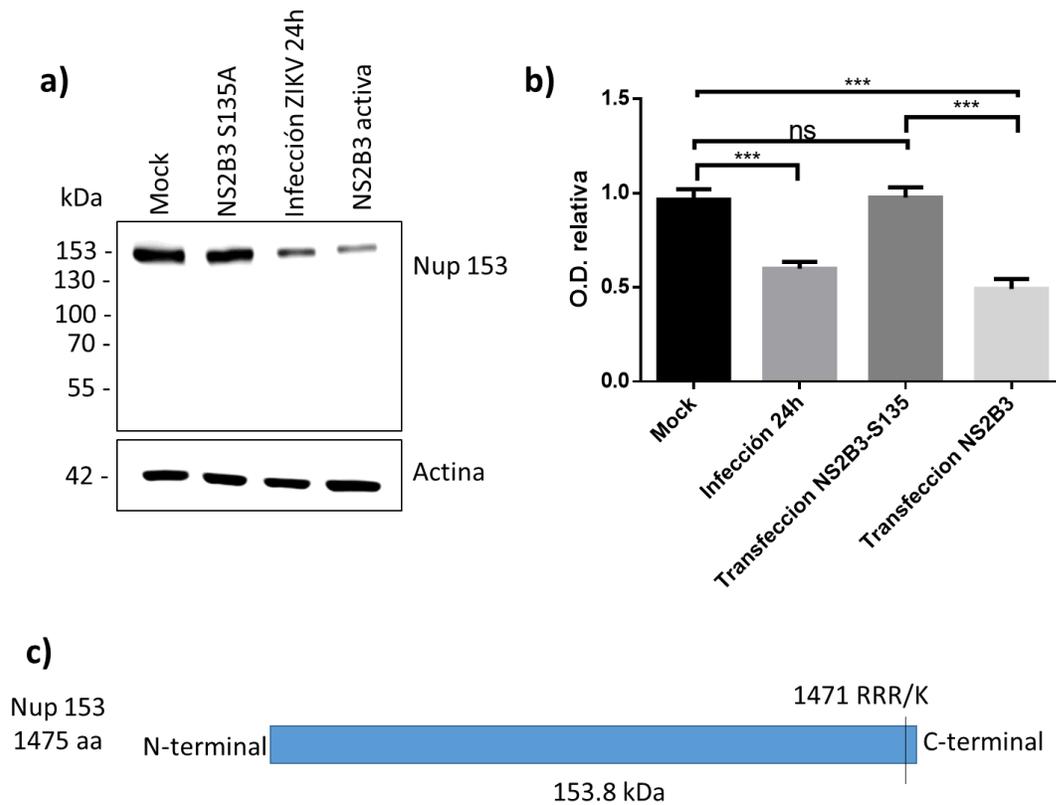


Figura 21. Western Blot de Nup153 en células infectadas con ZIKV y transfectadas con NS2B3 y NS2B3-S135A. Extractos proteicos de células Huh7 infectadas con ZIKV o transfectadas con la proteína NS2B3 o NS2B3S135A por 24 y 48 h respectivamente se sometieron a análisis por Western-blot (a) usando anticuerpos anti-Nup153, b) ANOVA one way de la O.D. relativa del estado de Nup153 en los diferentes grupos ($p < 0.05$), c) mapa de los cortes de NS3 de flavivirus en la Nup153, cortes predichos por CutDB.

Integridad de TPR durante la infección con ZIKV y transfección de NS3 en células Huh7

Otra de las Nups con funciones importantes en el transporte núcleo-citoplasma es la TPR. Al igual que en los casos anteriores, se analizó su integridad durante la infección con ZIKV y en células transfectadas con NS2B3 y NS2B3-S135A mediante Western Blot (Figura 22a y 22b). En este caso también se observó una reducción en la cantidad de proteína en las células infectadas con ZIKV y transfectadas con la proteasa activa. Dicha reducción en la cantidad de proteína no se observó en el grupo control ni en las células transfectadas con la proteasa inactiva, sugiriendo que TPR también es blanco de degradación durante la infección por ZIKV y que su degradación es dependiente de la actividad de NS2B3. (Figura 22b). Se predijo un sitio de corte en la posición 1021 de TPR por la proteasa NS3 de flavivirus (Figura 22c). Sin embargo, no se observaron fragmentos de TPR mediante Western Blot.

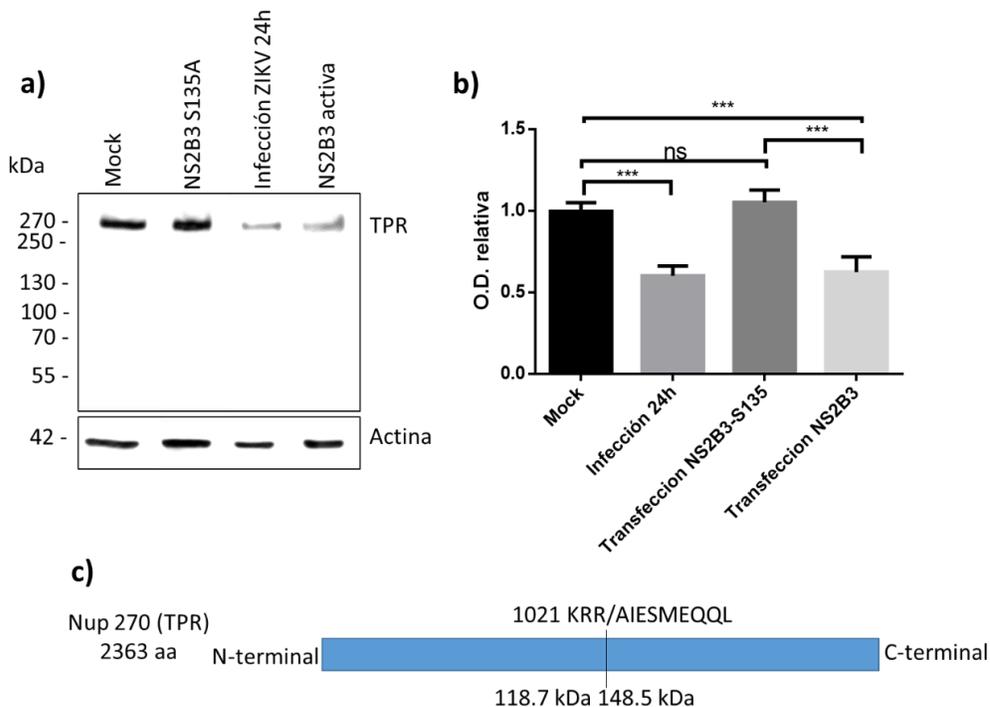
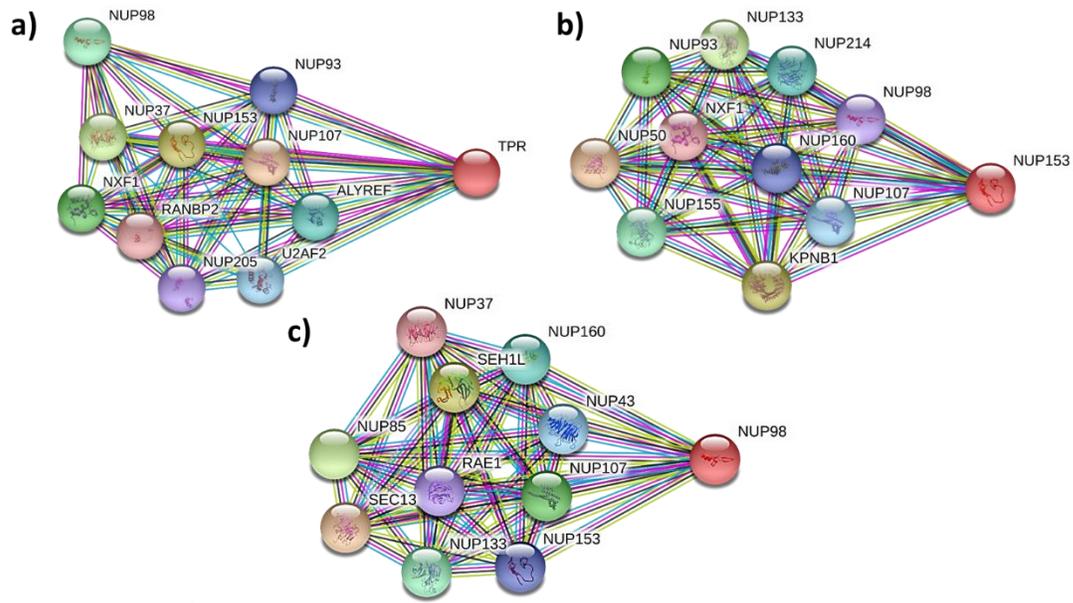


Figura 22. Western Blot de TPR en células infectadas con ZIKV y transfectadas con NS2B3 y NS2B3-S135A. Extractos proteicos de células Huh7 infectadas con ZIKV o transfectadas con la proteína NS2B3 o NS2B3S135A por 24 y 48 h respectivamente se sometieron a análisis por Western-blot (a) usando anticuerpos anti-TPR, b) ANOVA one way de la O.D. relativa del estado de TPR en

los diferentes grupos ($p < 0.05$), c) mapa de los cortes de NS3 de flavivirus en la TPR, cortes predichos por CutDB.

Posibles consecuencias de la alteración de Nup98, Nup153 y TPR por NS3 de ZIKV

Nuestros resultados indican que ocurre una reducción en la cantidad de Nup98, Nup153 y TPR por la acción directa o indirecta de la proteasa NS3 de ZIKV. Con la idea de conocer algunas de las posibles consecuencias que tendría la degradación de las tres Nups se construyeron redes de interacción de dichas nucleoporinas con otras proteínas (Figura 23 a-c). Se encontró que TPR y Nup153 interactúan con proteínas que participan en el importe de proteínas al núcleo, en el caso de Nup98 y TPR se encontró que interactúan con proteínas que participan en el exporte de mRNAs (Figura 23 d). Por lo que las alteraciones en TPR, Nup153 y Nup98 por la proteasa de NS3 de ZIKV podrían afectar el importe de proteínas a núcleo y el exporte de mRNAs. Ambas vías deberán ser analizadas en estudios posteriores.



d)

Importe de proteínas	Exporte de mRNAs
RANBP2 Implicado en la importación de proteínas mediada Ran-GTP	NXF1 Factor de exporte nuclear
KPNB1 Importina β, Participa en el importe de proteínas	U2AF2 Participa en el splicing de mRNAs
	ALYREF Participa en el exporte de mRNAs
	RAE1 Participa en el transporte de RNP, mRNA y formación del huso mitótico

Figura 23. Redes de interacción de TPR, Nup153 y Nup98; nucleoporinas alteradas por la proteasa NS3 de ZIKV. a-c) redes de interacciones de TPR, Nup153 y Nup98, construidas con STRING, d) Funciones de las proteínas que interactúan con TPR, Nup153 y Nup98.

Discusión

ZIKV pertenece a la familia *Flaviviridae*, cuya replicación es citoplasmática; sin embargo, se ha reportado que el núcleo celular juega un papel importante durante su replicación (Lopez-Denman & Mackenzie, 2017b).

En este sentido, se ha observado que proteínas del virus migran a núcleo durante su replicación como lo hace la proteína estructural C, la cual participa en la formación de la cápside viral y NS5 que tiene función metil-transferasa y RNA polimerasa dependiente de RNA (Armstrong, Hou, & Tang, 2017; Song et al., 2017; Barzon et al., 2016; Saiz et al., 2016).

La función de la proteína C en el núcleo aun no está entendida totalmente. Sin embargo, mutaciones en su NLS reducen la producción de viriones. Interesantemente, el importe de C al núcleo es por la vía clásica, esto es a través de importina α/β y además C interactúa con la helicasa DAXX evitando la apoptosis vía Fas ligando (Bhuvanankantham, Chong, & Ng, 2009; Mori et al., 2005; Netsawang et al., 2010).

En el caso de NS5, que es la proteína más grande y conservada entre los flavivirus, tiene una NLS conservada entre los miembros de su familia y la mutación en esta reduce la formación de viriones. Además, se ha visto que la inhibición de la exportina CRM1 con Leptomycin B acumula a NS5 en núcleo. Debido a su tamaño requiere el importe activo al núcleo vía importina α/β para ingresar a este y la inhibición de esta vía con ivermectina reduce la formación de viriones. (Johansson, Brooks, Jans, & Vasudevan, 2001; Pryor et al., 2007; Rawlinson, Pryor, Wright, & Jans, 2009).

En el laboratorio se ha observado que la proteasa NS3 de DENV procesa a la Nup153, Nup98 y Nup62. También, se observó que durante la infección con ZIKV se alteraban TPR y Nup62. Sin embargo, hacía falta la evidencia experimental para validar que la NS3 de ZIKV tiene la misma función que la NS3 de DENV sobre las nucleoporinas. Para ello en este trabajo se comparó la triada catalítica de NS3 (H51, D75, S135) de diferentes flavivirus, con el fin de analizar si esta secuencia es conservada entre éstos. Después de realizar un alineamiento de la NS3 de DENV4, DENV2, SPONV, WNV, JEV y ZIKV se encontró que la triada catalítica está

altamente conservada en estos flavivirus, por lo que probablemente la NS3 de ZIKV también pueda procesar nucleoporinas. Además, la NS3 de ZIKV filogenéticamente está más relacionada a la NS3 de SPONV que a la de DENV, por lo que esta relación también podría contribuir a la diferencias y similitudes de sus blancos de acción.

Para abundar un poco más sobre la posible similitud en la función de NS3 de DENV y ZIKV sobre las nucleoporinas, se realizó una superposición estructural de estas proteínas obteniendo una similitud del 66% en sus aminoácidos y en su estructura. Probablemente esto pueda explicar las diferencias o similitudes de sus nucleoporinas blanco encontradas tanto por Cervantes-Salazar et al., (Datos no publicados) el presente trabajo, ya que NS3 de DENV2 y DENV4 procesan a Nup153, Nup98 y Nup62, mientras que la NS3 de ZIKV procesa a TPR, Nup153 y Nup98.

En la literatura se menciona que proteasas de Poliovirus y Rhinovirus procesan nucleoporinas para afectar el transporte núcleo-citoplasma de proteínas celulares y mRNAs. Estas proteasas se localizan en núcleo y citoplasma durante este procesamiento (Tian, Cui, Zhang, Wei, & Zhang, 2011; Walker et al., 2013). La NS3 de ZIKV se ha reportado localizada en citoplasma (Lopez-Denman & Mackenzie, 2017b) y recientemente Cervantes-Salazar et al., (Datos no publicados) la encontró localizada en núcleo. Para conocer si NS3 de ZIKV puede importarse y exportarse fuera del núcleo, se analizó su secuencia para conocer si contiene secuencias de localización nuclear (NLS) y secuencias de exporte nuclear (NES). Usando diferentes herramientas computacionales se encontraron 4 posibles secuencias de NLS y 3 posibles secuencias de NES. Por lo tanto, NS3 de ZIKV puede importarse y exportarse fuera del núcleo; sin embargo, hace falta evidencia experimental para conocer cuál o cuáles de estas secuencias predichas son en realidad NLS y NES. Además, se confirmó la presencia de NS3 en núcleo de manera experimental. Para ello, se realizó la transfección en células Huh7 con el plásmido que codifica para las proteínas NS2BNS3 de DENV y otras células se infectaron con ZIKV. En este ensayo se encontró que NS3 se localiza en el núcleo y citoplasma, tanto en las

células infectadas con ZIKV como en las células transfectadas con NS3, dicho dato concuerda con lo reportado anteriormente por Cervantes-Salazar et al., (Datos no publicados) durante la infección con ZIKV.

Se ha documentado que algunas proteínas virales de otros virus afectan el complejo del poro nuclear y específicamente a las nucleoporinas TPR, Nup153, Nup98 y Nup62. Esta alteración la realizan mediante proteasas virales como el caso de Poliovirus y Rhinovirus, o mediante otros mecanismos como afectación transcripcional de genes de nucleoporinas en el caso de reovirus aviar (ARV) e inhibición estructural mediante la unión de proteínas virales a Nups, como en el caso del virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el virus herpes simple (HSV-1) (Faria et al., 2005; Gustin & Sarnow, 2001; Huang et al., 2015; Malik et al., 2012; N. Park et al., 2008; Watters & Palmenberg, 2011).

En este trabajo se analizó a TPR, Nup153, Nup98 y Nup62, durante la infección con ZIKV y en células transfectadas con NS3 de ZIKV.

TPR o Nup270, se encuentra localizada en la canastilla nuclear del NPC y participa principalmente en el transporte de proteínas y mRNAs (Frosst et al., 2002; Rajanala & Nandicoori, 2012). Durante la infección con ZIKV y transfección con NS3, se observaron alteraciones en la cantidad de TPR mediante Western Blot. Demostrando que la NS3 de ZIKV es la responsable de este procesamiento; alteración no observada durante la infección con DENV2 y DENV4 (datos no publicados). Sin embargo, las diferencias estructurales de las NS3 de ZIKV y DENV demostradas en este trabajo podrían afectar el blanco de acción, como es el caso de las proteasas 2A de Rhinovirus humanos, de las especies HRV-A, HRV-B y HRV-C, las cuales debido a la variabilidad estructural entre ellas procesan diferentes nucleoporinas (Watters & Palmenberg, 2011).

En el caso de Nup62 también se observaron diferencias entre el procesamiento por la NS3 de DENV y ZIKV. Esta Nup se encuentra localizada en el anillo central del NPC y participa en el transporte de mRNAs e importe de proteínas (Dickmanns et al., 2015). Durante la infección con DENV se observa una deslocalización y reducción en la cantidad de Nup62 por la acción de NS3, ya que en condiciones de no infección

se encuentra localizada en núcleo y durante la infección con DENV2 y DENV4 se deslocaliza a citoplasma. También se observa una reducción en la cantidad de Nup62 mediante Western Blot (datos no publicados). En este trabajo durante la infección con ZIKV y transfección de la NS3, no se observan anomalías en la ubicación celular, ni reducción de la Nup62. Sin embargo, la base de datos CutDB predijo un sitio de corte en el aminoácido 508 de la Nup62, y el fragmento generado por este corte es de 1.5 kDa, por lo que no se apreciaría con detalle mediante la técnica de Western Blot si la NS3 de ZIKV alterara esta Nup. Para confirmar si Nup62 es blanco de NS3, sería necesario realizar un zimograma, fijando a la Nup62 en un gel como sustrato de la NS3 de ZIKV.

Nup153 se encuentra localizada en el complejo de la canastilla nuclear y tiene sitios de unión para importina α/β , transportinas y RanGTP; Nup153 participa en el transporte de mRNAs, snRNAs y 5S rRNA (Dickmanns et al., 2015; Ogawa et al., 2012). Al igual que con la infección de DENV2 y DENV4, se observó que la NS3 de ZIKV también altera esta Nup. Usando microscopía confocal, para observar a la Nup153 en células Huh7 se encontró una reducción en la fluorescencia y, mediante Western Blot se observó una reducción en la cantidad de esta Nup en células infectadas con ZIKV y transfectadas con NS3.

Nup98 también es procesada por la NS3 de ZIKV, al igual que con la NS3 de DENV2 y DENV4. Esta Nup se encuentra localizada en el complejo del anillo interno y participa en el ensamblaje del complejo de transporte de proteínas (importina α/β y cargo) y en el transporte de mRNAs (Dickmanns et al., 2015). Durante la infección con DENV, Nup98 se deslocaliza de la periferia nuclear hacia el interior del núcleo y hay una reducción en la cantidad de proteína (datos no publicados). En este trabajo se observó que durante la infección con ZIKV la Nup98 se deslocaliza hacia el interior del núcleo y hacia fuera de éste, además se observa una reducción de la fluorescencia y dicho efecto también es observado por Western Blot en células infectadas con ZIKV y transfectadas con NS3, demostrando que la NS3 de ZIKV es la responsable de alterar esta Nup.

En conclusión, durante la infección con ZIKV la proteasa NS3 procesa a TPR, Nup153 y Nup98. En los ensayos de Western Blot no fue posible observar los residuos predichos por CutDB a las 24 h de infección con ZIKV y 48 h post-transfección con la NS3. Sin embargo, esta ausencia de residuos post-procesamiento de las Nups por las proteasas virales también ha sido reportada en las proteasas 2A de Rhinovirus humanos HRV-A, HRV-B y HRV-C a tiempos tardíos de infección, ya que a tiempos tempranos de la infección con Rhinovirus humanos se pueden observar los residuos en los ensayos de Western Blot y a tiempos tardíos no. Este mismo efecto se ha visto durante la infección con Enterovirus y Poliovirus (N. Park et al., 2008; Nogi Park, Schweers, & Gustin, 2015; Nogi Park, Skern, & Gustin, 2010; Watters & Palmenberg, 2011). Por lo que se tendría que realizar un estudio a diferentes tiempos de la infección con ZIKV para poder observar estos residuos generados por la NS3. Otra posibilidad es que los fragmentos generados por la NS3, sean posteriormente degradados por el proteasoma.

El posible efecto del procesamiento de estas nucleoporinas tiene que ver con la alteración del tráfico núcleo-citoplasma de proteínas y mRNAs, como en la infección con DENV en la que se ve afectada la localización de mRNAs ya que se interrumpe el transporte de éstos (datos no publicados). En el caso de TPR se ha visto que reovirus aviar (ARV) regula su transcripción, lo que conduce a la acumulación de p53 y p21, deteniendo el ciclo celular y favoreciendo la autofagia permitiendo la degradación de lípidos utilizados por el virus para su replicación (Huang et al., 2015). Poliovirus y Rhinovirus humanos procesan a las Nup98 y Nup153 inhibiendo el transporte de proteínas y transporte de mRNAs, evadiendo la respuesta inmune antiviral y apoderándose de la maquinaria traduccional para replicarse. También se ha observado durante la infección una deslocalización, hacia citoplasma, de proteínas nucleares que participan en la replicación del genoma viral (Gustin & Sarnow, 2001; N. Park et al., 2008; Watters & Palmenberg, 2011). Resultaría de gran interés estudiar las consecuencias del procesamiento de Nups por la NS3 de ZIKV, para conocer la participación de estas alteraciones en la replicación viral y para el desarrollo de posibles blancos farmacológicos.

Conclusiones

- ✓ El sitio catalítico de NS3 de ZIKV está altamente conservado entre los diferentes flavivirus
- ✓ La NS3 de ZIKV y la de DENV tienen una similitud del 66%, por lo tanto, sus blancos de acción podrían ser similares
- ✓ NS3 contiene 4 posibles secuencias de NLS y 3 posibles secuencias de NES, lo que sugiere que puede importarse al núcleo y exportarse fuera del mismo.
- ✓ La localización de NS3 en células infectadas y transfectadas se observa en citoplasma y núcleo a las 24 h de infección y 48 h de transfección.
- ✓ La presencia de la proteasa NS3 de ZIKV afecta la localización e integridad de Nup98, Nup153 y TPR
- ✓ La presencia de la proteasa NS3 de ZIKV no afecta la localización e integridad de Nup62
- ✓ NS2B3-S135A (proteasa inactiva) no afecta la integridad del NPC

Perspectivas

- Realizar mutagénesis en las secuencias predichas de NLS y NES de NS3 de ZIKV, con el fin de determinar la funcionalidad de ambas secuencias.
- ¿Se afecta la ubicación celular de mRNAs durante la infección con ZIKV por el daño del NPC?
- ¿Se afecta el importe, exporte de proteínas celulares durante la infección con ZIKV por el daño al NPC?

Bibliografía

- Armstrong, N., Hou, W., & Tang, Q. (2017). Biological and historical overview of Zika virus. *World Journal of Virology*, 6(1), 1–8.
<https://doi.org/10.5501/wjv.v6.i1.1>
- Aubry, M., Teissier, A., Huart, M., Merceron, S., Vanhomwegen, J., Roche, C., ... Cao-Lormeau, V. M. (2017). Zika virus seroprevalence, French Polynesia, 2014-2015. *Emerging Infectious Diseases*, 23(4), 669–672.
<https://doi.org/10.3201/eid2304.161549>
- Barzon, L., Trevisan, M., Sinigaglia, A., Lavezzo, E., & Palù, G. (2016). Zika virus: From pathogenesis to disease control. *FEMS Microbiology Letters*, 363(18), 1–17. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw202>
- Beck, M., & Hurt, E. (2016). The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(2), 73–89. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.147>
- Bhuvanakantham, R., Chong, M. K., & Ng, M. L. (2009). Specific interaction of capsid protein and importin- α/β influences West Nile virus production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(1), 63–69.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.108>
- Blevins, M. B., Smith, A. M., Phillips, E. M., & Powers, M. A. (2003). Complex formation among the RNA export proteins Nup98, Rae1/Gle2, and TAP. *Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 20979–20988.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M302061200>
- Chen, N.-Y., Zhou, L., Gane, P. J., Opp, S., Ball, N. J., Nicastro, G., ... Fassati, A. (2016a). HIV-1 capsid is involved in post-nuclear entry steps. *Retrovirology*, 13(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0262-0>
- Chen, N.-Y., Zhou, L., Gane, P. J., Opp, S., Ball, N. J., Nicastro, G., ... Fassati, A. (2016b). HIV-1 capsid is involved in post-nuclear entry steps. *Retrovirology*,

13(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0262-0>

Cohen, S., Au, S., & Panté, N. (2011). How viruses access the nucleus. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(9), 1634–1645.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.009>

Díaz-Quiñonez, J. A., López-Martínez, I., Torres-Longoria, B., Vázquez-Pichardo, M., Cruz-Ramírez, E., Ramírez-González, J. E., ... Kuri-Morales, P. (2016).

Evidence of the presence of the Zika virus in Mexico since early 2015. *Virus Genes*, 52(6), 855–857. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1384-0>

Dick, G., Kitchen, S., & AJ, H. (1952). Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509–520. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.07.024>

<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.07.024>

Dickmanns, A., Kehlenbach, R. H., & Fahrenkrog, B. (2015). Nuclear Pore Complexes and Nucleocytoplasmic Transport: From Structure to Function to Disease. *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 320).

Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.07.010>

Faria, P. A., Chakraborty, P., Levay, A., Barber, G. N., Ezelle, H. J., Enninga, J., ... Fontoura, B. M. A. (2005). VSV disrupts the Rae1/mrnp41 mRNA nuclear export pathway. *Molecular Cell*, 17(1), 93–102.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.023>

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.023>

Frosst, P., Guan, T., Subauste, C., Hahn, K., & Gerace, L. (2002). Tpr is localized within the nuclear basket of the pore complex and has a role in nuclear protein export. *The Journal of Cell Biology*, 156(4), 617–630.

<https://doi.org/10.1083/jcb.200106046>

Gustin, K. E., & Sarnow, P. (2001). Effects of poliovirus infection on nucleocytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *EMBO Journal*,

20(1–2), 240–249. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.240>

Hennessey M., F. M. and S. J. E. (2016). Zika Virus Spreads to New Areas -

Regions of the Americas, May 2015 - January 2016. *Morbidity and Mortality*

Weekly Report, 65(3), 55–58.

- Hezwani, M., & Fahrenkrog, B. (2017). The Functional Versatility of The Nuclear Pore Complex Proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.004>
- Huang, W. R., Chiu, H. C., Liao, T. L., Chuang, K. P., Shih, W. L., & Liu, H. J. (2015). Avian reovirus protein p17 functions as a nucleoporin Tpr suppressor leading to activation of p53, p21 and PTEN and inactivation of PI3K/AKT/mTOR and ERK signaling pathways. *PLoS ONE*, 10(8), 1–31.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133699>
- Hutten, S., & Kehlenbach, R. H. (2006). Nup214 is required for CRM1-dependent nuclear protein export *in vivo*. *Molecular and Cellular Biology*, 26(18), 6772–6785. <https://doi.org/10.1128/MCB.00342-06>
- Johansson, M., Brooks, A. J., Jans, D. A., & Vasudevan, S. G. (2001). A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin- β and the viral helicase, NS3. *Journal of General Virology*, 82(4), 735–745.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-4-735>
- Jovanovic-Talisman, T., & Zilman, A. (2017). Protein Transport by the Nuclear Pore Complex: Simple Biophysics of a Complex Biomachine. *Biophysical Journal*, 113(1), 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.05.024>
- Kabachinski, G., & Schwartz, T. U. (2015). The nuclear pore complex - structure and function at a glance. *Journal of Cell Science*, 128(3), 423–429.
<https://doi.org/10.1242/jcs.083246>
- Kang, C., Keller, T. H., & Luo, D. (2017). Zika Virus Protease: An Antiviral Drug Target. *Trends in Microbiology*, xx, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.001>
- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009). Six classes of nuclear localization signals

- specific to different binding grooves of importin α . *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 478–485. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807017200>
- la Cour, T., Gupta, R., Rapacki, K., Skriver, K., Poulsen, F. M., & Brunak, S. (2003). NESbase version 1.0: A database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 393–396. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg101>
- Lanciotti, R. S., Lambert, A. J., Holodniy, M., Saavedra, S., & del Carmen Castillo Signor, L. (2016). Phylogeny of zika virus in western Hemisphere, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 22(5), 933–935. <https://doi.org/10.3201/eid2205.160065>
- Li, C., Goryaynov, A., & Yang, W. (2016). The selective permeability barrier in the nuclear pore complex. *Nucleus*, 7(5), 430–446. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1238997>
- Lopez-Denman, A. J., & Mackenzie, J. M. (2017a). The IMPORTance of the nucleus during flavivirus replication. *Viruses*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/v9010014>
- Lopez-Denman, A. J., & Mackenzie, J. M. (2017b). The IMPORTance of the nucleus during flavivirus replication. *Viruses*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/v9010014>
- Lussignol, M., Kopp, M., Molloy, K., Vizcay-Barrena, G., Fleck, R. A., Dorner, M., ... Catanese, M. T. (2016). Proteomics of HCV virions reveals an essential role for the nucleoporin Nup98 in virus morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(9), 2484–2489. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518934113>
- MacNamara, F. N. (1954). Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(2), 139–145. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(54\)90006-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(54)90006-1)
- Malik, P., Tabarraei, A., Kehlenbach, R. H., Korfali, N., Iwasawa, R., Graham, S.

- V., & Schirmer, E. C. (2012). Herpes simplex virus ICP27 protein directly interacts with the nuclear pore complex through Nup62, inhibiting host nucleocytoplasmic transport pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 12277–12292. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.331777>
- Marini, B., Kertesz-Farkas, A., Ali, H., Lucic, B., Lisek, K., Manganaro, L., ... Lusic, M. (2015). Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection. *Nature*, 521(7551), 227–231. <https://doi.org/10.1038/nature14226>
- Medin, C. L., & Rothman, A. L. (2017). Zika virus: The agent and its biology, with relevance to pathology. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 141(1), 33–42. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0409-RA>
- Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2017). Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host and Microbe*, 21(2), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>
- Ming, G., Tang, H., & Song, H. (2016). Advances in Zika Virus Research: Stem Cell Models, Challenges, and Opportunities. *Cell Stem Cell*, 19(6), 690–702. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.014>
- Mori, Y., Okabayashi, T., Yamashita, T., Zhao, Z., Wakita, T., Yasui, K., ... Matsuura, Y. (2005). Nuclear Localization of Japanese Encephalitis Virus Core Protein Enhances Viral Replication. *J Virol*, 79(6), 3448–3458. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3448>
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(1), 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Musso, D., & Gubler, D. (2016). Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 487–524. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15.Address>
- Netsawang, J., Noisakran, S., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Wongwiwat, W., Malasit, P., ... Limjindaporn, T. (2010). Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus Research*,

147(2), 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.11.012>

Ogawa, Y., Miyamoto, Y., Oka, M., & Yoneda, Y. (2012). The Interaction Between Importin- α and Nup153 Promotes Importin- α/β -Mediated Nuclear Import.

Traffic, 13(7), 934–946. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01367.x>

Oka, M., Asally, M., Yasuda, Y., Ogawa, Y., Tachibana, T., & Yoneda, Y. (2010). The Mobile FG Nucleoporin Nup98 Is a Cofactor for Crm1-dependent Protein Export Masahiro. *Molecular Biology of the Cell*, 21(11), 1885–1896.

<https://doi.org/10.1091/mbc.E09>

OMS. (2017). *Informe Sobre La Situación Virus De Zika, Microcefalia y Síndrome De Guillain-Barre*. Retrieved from

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254747/1/zikasitrep10Mar17-spa.pdf?ua=1>

Park, N., Katikaneni, P., Skern, T., & Gustin, K. E. (2008). Differential Targeting of Nuclear Pore Complex Proteins in Poliovirus-Infected Cells. *Journal of Virology*, 82(4), 1647–1655. <https://doi.org/10.1128/JVI.01670-07>

Park, N., Schweers, N. J., & Gustin, K. E. (2015). Selective Removal of FG Repeat Domains from the Nuclear Pore Complex by Enterovirus 2A^{pro}. *Journal of Virology*, 89(21), 11069–11079. <https://doi.org/10.1128/JVI.00956-15>

Park, N., Skern, T., & Gustin, K. E. (2010). Specific cleavage of the nuclear pore complex protein Nup62 by a viral protease. *Journal of Biological Chemistry*, 285(37), 28796–28805. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143404>

Plourde, A. R., & Bloch, E. M. (2016). A Literature Review of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1185–1192.

<https://doi.org/10.3201/eid2207.151990>

Pryor, M. J., Rawlinson, S. M., Butcher, R. E., Barton, C. L., Waterhouse, T. A., Vasudevan, S. G., ... Davidson, A. D. (2007). Nuclear Localization of Dengue Virus Nonstructural Protein 5 Through Its Importin α / β – Recognized Nuclear Localization Sequences is Integral to Viral Infection, (18), 795–807.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00579.x>

Rabaan, A. A., Bazzi, A. M., Al-Ahmed, S. H., Al-Ghaith, M. H., & Al-Tawfiq, J. A. (2017). Overview of Zika infection, epidemiology, transmission and control measures. *Journal of Infection and Public Health*, *10*(2), 141–149.

<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.05.007>

Rajanala, K., & Nandicoori, V. K. (2012). Localization of nucleoporin Tpr to the nuclear pore complex is essential for Tpr mediated regulation of the export of unspliced RNA. *PLoS ONE*, *7*(1), 1–17.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029921>

Rather, I. A., Lone, J. B., Bajpai, V. K., Paek, W. K., & Lim, J. (2017). Zika Virus: An Emerging Worldwide Threat. *Frontiers in Microbiology*, *8*(July), 1–7.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01417>

Rawlinson, S. M., Pryor, M. J., Wright, P. J., & Jans, D. A. (2009). CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(23), 15589–15597. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808271200>

Rothballer, A., & Kutay, U. (2012). SnapShot: The Nuclear Envelope I. *Cell*, *150*(4), 868–868.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.024>

Saiz, J. C., Vázquez-Calvo, Á., Blázquez, A. B., Merino-Ramos, T., Escribano-Romero, E., & Martín-Acebes, M. A. (2016). Zika virus: The latest newcomer. *Frontiers in Microbiology*, *7*(496), 1–19.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00496>

Santos, V. S., Oliveira, S. J. G., Gurgel, R. Q., Lima, D. R. R., dos Santos, C. A., & Martins-Filho, P. R. S. (2017). Microcephaly in Twins Due to the Zika Virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *97*(1), 151–154.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-1021>

Secretaria de Salud. (2017). “Casos C onfirmados de Enfermedad por Virus del Zika ”, *Semana Epidemiológica 03 del 2017*.

- Sheng, Z.-Y., Gao, N., Wang, Z.-Y., Cui, X.-Y., Zhou, D.-S., Fan, D.-Y., ... An, J. (2017). Sertoli Cells Are Susceptible to ZIKV Infection in Mouse Testis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00272>
- Shuaib, W., Stanazai, H., Abazid, A. G., & Mattar, A. A. (2016). Re-Emergence of Zika Virus: A Review on Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *The American Journal of Medicine*, 129(8), 879.e7-879.e12. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2016.02.027>
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*, 308, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001>
- Tian, W., Cui, Z., Zhang, Z., Wei, H., & Zhang, X. (2011). Poliovirus 2Apro induces the nucleic translocation of poliovirus 3CD and 3C' proteins. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(1), 38–44. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq112>
- Tilgner, M., & Shi, P. Y. (2004). Structure and function of the 3' terminal six nucleotides of the West Nile virus genome in viral replication. *Journal of Virology*, 78(15), 8159. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8159>
- Tognarelli, J., Ulloa, S., Villagra, E., Lagos, J., Aguayo, C., Fasce, R., ... Fernández, J. (2016). A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Archives of Virology*, 161(3), 665–668. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2695-5>
- Trotman, L. C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R. P., & Greber, U. F. (2001). Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nature Cell Biology*, 3(12), 1092–100. <https://doi.org/10.1038/ncb1201-1092>
- Walker, E. J., Younessi, P., Fulcher, A. J., McCuaig, R., Thomas, B. J., Bardin, P. G., ... Ghildyal, R. (2013). Rhinovirus 3C Protease Facilitates Specific Nucleoporin Cleavage and Mislocalisation of Nuclear Proteins in Infected Host Cells. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071316>

Watters, K., & Palmenberg, A. C. (2011). Differential processing of nuclear pore complex proteins by rhinovirus 2A proteases from different species and serotypes. *Journal of Virology*, *85*(20), 10874–83.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00718-11>

Wente, S. R., & Rout, M. P. (2010). The Nuclear Pore Complex and Nuclear Transport. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(10), a000562–a000562. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000562>

Zanluca, C., De Melo, V. C. A., Mosimann, A. L. P., Dos Santos, G. I. V., dos Santos, C. N. D., & Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *110*(4), 569–572.
<https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>