

CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

Tesis Doctoral

Estudio de las rutas de secreción de la proteína no estructural 1 (NS1) del
virus dengue en células de insecto

Por:

M.Sc. Ana Carolina Alcalá Aristiguieta

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias en Inféctomica y Patogénesis Molecular

Director de Tesis:

Dr. Juan Ernesto Ludert León

México D.F.

Diciembre, 2015.

Comité Tutorial

Director de Tesis:

Dr. Juan E. Ludert

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV

Asesores:

Dra. Ana Lorena Gutiérrez

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV

Dra. Rosa María del Angel

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV

Dr. José Luis Rosales

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV

Dra. Manuel Hernández

Departamento de Biología Celular, CINVESTAV

Dr. Humberto Lanz

Instituto Nacional de Salud Pública

Índice

	Pág.
Resumen	3
Summary	4
Introduction	5
Justificación	15
Hipótesis	15
Objetivo General	15
Objetivos	15
Específicos	
Materiales y	16
Métodos	
Resultados	27
Discusión	52
Conclusión	62
Perspectivas	62
Referencias	63

Agradecimientos

Agradezco a Conacyt por el financiamiento de mi estadia para la realización de este trabajo.

Al CINVESTAV por la oportunidad de culminar este trabajo en tan prestigiosa institución.

A mi tutor por confiar en mí una vez mas la ejecución de este proyecto.

A todos mis asesores, especialmente a la Dra. Rosa del Angel por permitirme comenzar este trabajo en su laboratorio.

A mi familia, quienes son mi pilar fundamental en la vida.

A todos mis compañeros de laboratorio y amigos que hicieron la estancia en el doctorado mucho mas llevadera en los momentos difíciles.

Resumen

La proteína no estructural 1 (NS1) del virus dengue es una glicoproteína de 40-50 KDa la cual se asocia como un dímero a membranas internas, a la membrana plasmática y es secretada como hexámero al medio extracelular. Existe la noción de que la NS1 es secretada solo desde células de vertebrados infectadas y no por células de mosquito. Este trabajo presenta evidencia que indica que la NS1 es secretada eficientemente desde células de mosquito. La NS1 se detectó mediante un inmunoensayo comercial en sobrenadantes celulares a partir de las 6 hpi, con un incremento continuo en su concentración hasta las 24 hpi. En paralelo, se determinó por diferentes métodos, la viabilidad celular a los mismos tiempos ensayados, los cuales arrojaron en promedio un 97% de viabilidad celular. Resultados obtenidos por microscopía confocal y electrónica, sugieren que la NS1 no se asocia con la membrana plasmática, pero que si es secretada como un hexámero. Para esclarecer la ruta seguida por NS1 para alcanzar el espacio extracelular, se realizaron tratamientos con brefeldina A, droga que inhibe el tránsito de proteínas a través de la ruta clásica de secreción y se evidenció que el tratamiento no afectó los niveles de NS1 en el sobrenadante de células C6/36HT. Este hallazgo fue corroborado al silenciar la expresión de la GTPasa del RE SAR1 que participa en la secreción de proteínas por la vía clásica y observar que no hubo variación de los niveles de NS1 en sobrenadantes. Estos resultados apuntan a que NS1 se estaría secretando por una vía alterna. Para determinar que ruta alterna pudiera estar siguiendo la NS1, se evaluó la vía de transporte de colesterol hacia la membrana plasmática y el espacio extracelular, en la que participa el Complejo Chaperón de Caveolina conformado entre otras proteínas por caveolina-1 (CAV1). Para ello se trataron células con el secuestrador de colesterol beta metil ciclodextrina (BMCD) y se silenció a la proteína CAV1. Ambos tratamientos, redujeron los niveles de NS1 en sobrenadantes de células C6/36HT, sin afectar la secreción de viriones. Resultados adicionales obtenidos in silico a través de métodos de mecánica clásica e in vitro por microscopía confocal sugieren que CAV1 y NS1 establecen interacciones directas en células infectadas. Estos resultados en conjunto, indican que la NS1 es secretada desde células de insecto utilizando una vía alterna, asociada a la secreción de colesterol, en concordancia con la naturaleza lipoproteína del hexámero de NS1. Este trabajo aporta nuevos datos en relación a la biología de la NS1 y abre interrogantes en relación al rol de la NS1 en el mosquito vector del virus del dengue.

Summary

Dengue is the most important mosquito borne viral disease to humans. It is endemic in over a 100 countries which reports nearly 100 million cases a year. The dengue virus, a member of the *Flaviviridae* family, presents a genome of positive single-stranded RNA of approximately 11 kb that encodes for 7 non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) and 3 structural proteins (C, prM, E), all derived from the proteolytic processing of a single polyprotein. Dengue virus NS1 is a glycoprotein of 46-50 kDa, highly conserved among flaviviruses, which associates as a dimer to internal and cytoplasmic membranes and is also secreted, as a hexamer, to the extracellular milieu. Despite the fact that *Flaviviruses* cycles between vertebrate and invertebrate hosts, the notion exist that NS1 is secreted only from infected vertebrate and not mosquito cells. In this work, evidence is presented showing that NS1 is secreted efficiently by infected mosquito cells. NS1 was detected in cell supernatants starting at 6 hpi with a continuous concentration increase up to 24 hpi. Nevertheless, cell viability showed an average cell survival of 97%. At variance with observations with vertebrate cells, NS1 does not seem to associate with the cytoplasmic membrane of insect cells. Finally, evidence is presented indicating that NS1 is secreted from insect cells as a barrel-shaped hexamer. In order to explore the route followed by NS1 to reach the extracellular space, insect cells were treated with brefeldin A (BFA) and beta methyl cyclodextrin (BMCD). The results showed that treatment with BMCD, but not with BFA, reduced significantly the release of NS1. In agreement, silencing the expression of caveolin-1 (CAV1, a key component of the chaperone caveolin complex that transport cholesterol inside the cell) but not of SAR1 (a GTPase that participates in the classical secretory pathway) also results in a significant reduction of the secretion of NS1. These results suggest that NS1 is released from infected insect cell via an unconventional secretory route with the participation of CAV1. *In silico* experiments carried out using classical mechanics suggest that interactions between the caveolin binding domain present in NS1 and the scaffolding domain of CAV1 are highly favoured. Finally, evidence was obtained suggesting that NS1 and CAV1 colocalized dynamically in infected cells. These findings provide new insights into the biology of NS1 and open questions about the role of secreted NS1 in the vector mosquito.

1. INTRODUCCION

El dengue es la enfermedad de más rápida diseminación registrada en el mundo. En los últimos 50 años, su incidencia se ha incrementado 30 veces debido a la expansión geográfica a nuevos países y en la década actual desde zonas rurales a urbanas. Aproximadamente, 4 billones de personas se encuentran en riesgo de infección en 128 países y se estima que anualmente ocurren mas de 390 millones de infecciones (Brady y cols., 2012).

El virus del dengue (DENV) es un virus pequeño, envuelto, de aproximadamente 50 nm de diámetro, con un genoma de ARN de polaridad positiva de 10.7 Kb, el cual codifica para tres proteínas estructurales (C, prM, y E) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5) (Fischl y Bartenschlager, 2011). DENV pertenece al genero *Flavivirus*, familia *Flaviviridae* y comprende 4 serotipos (DENV1-4). Además, se han identificado distintos genotipos o linajes dentro de cada serotipo, lo que indica una extensa variabilidad genética dentro de cada serotipo (Fischl y Bartenschlager, 2011)

Formas Clínicas de la enfermedad

La enfermedad causada por el DENV se presenta en 3 formas clínicas diferentes: la fiebre por dengue (FD), la fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y el síndrome de shock por dengue (SSD). La fiebre por dengue cursa con fiebre alta, dolor de cabeza, dolor retroorbital y en las articulaciones y nausea, entre otros síntomas clínicos. La mayoría de las personas afectadas se recuperan después de 5 o 6 días. Sin embargo, ciertos pacientes, especialmente niños, pueden evolucionar hacia las formas más severas de la enfermedad, como lo son el FHD/SSD. La FHD/SSD se caracteriza por un aumento abrupto de la permeabilidad capilar, principalmente en el área del abdomen y los pulmones, que de no ser controlada clínicamente puede resultar en hipovolemia, shock y el fallecimiento del paciente (Martina y cols., 2009). Son estas formas severas de la infección por dengue las que generan los mayores costos en términos de gastos de hospitalización y de mortalidad. Las personas que sufren una infección por dengue,

usualmente desarrollan protección inmunológica de por vida, contra infecciones causadas por el mismo serotipo infectante (Weaver y Reisen; 2010).

Los humanos son los principales huéspedes amplificadores del DENV. Cuando el virus circula en la sangre de un humano virémico, este puede ser ingerido por mosquitos hembras del género *Aedes* (*Stegomyia*), principalmente *A. aegypti* y en menor proporción *A. albopictus* y algunos otros vectores endémicos como *A. polynesiensis* en la Polinesia Francesa (Van mai y cols., 2009), mientras estas se alimentan de la sangre del hospedero. El virus infecta al mosquito pasando a través de su estómago y se disemina en este en un periodo de 8-12 días, replicándose en diferentes tejidos del insecto vector, infectando finalmente las glándulas salivales. Luego de este tiempo, el virus puede ser transmitido a otros humanos cuando el mosquito, el cual permanecerá infectado de por vida, se alimente nuevamente.

La dinámica del ciclo de transmisión del virus puede verse influenciado por diversos factores ya sean ambientales, climáticos, inherentes a las interacciones huésped-patógeno y a los factores inmunológicos de la población (Nguyen y cols., 2013; van Panhuis y cols., 2015).

Ciclo de Replicación del Dengue:

El virus dengue ingresa a la célula blanco (principalmente células dendríticas, monocitos y macrófagos) mediante endocitosis dependiente de clatrina. El ARN viral de polaridad positiva es traducido en el retículo endoplásmico rugoso (RER) rindiendo una poliproteína. Esta poliproteína es co y postraduccionalmente procesada en 3 proteínas estructurales (C, prM y E), las que constituyen la armazón del virión y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) involucradas en la replicación, ensamblaje y modulación de la respuesta inmune de la célula huésped (Somnuk y cols., 2011). Presumiblemente, NS4A junto con factores adicionales (virales y de la célula), inducen rearrreglos de membrana, lo cual incluye la formación de vesículas por la invaginación del RER (Welsch y cols., 2009). Se piensa que las vesículas pueden servir como sitios de replicación del ARN y están conectadas con el citosol a través de poros, los cuales se presume, sirven como sitios de salida para el ARN de la progenie viral. Este ARN se asocia con la proteína de cápside, probablemente formando un complejo cápside-ARN no estructurado. Este complejo es

invaginado hacia el lumen del RER adquiriendo una membrana lipídica, en la cual se incorporan heterodímeros de la proteína E y prM. Las partículas inmaduras son transportadas a lo largo de la vía secretora celular, durante la cual sufren un paso de maduración en el trans-golgi, el cual implica el procesamiento proteolítico de la prM mediado por la proteasa celular furina, para formar el virión maduro. El clivaje de la proteína M es ineficiente y una proporción variable de viriones liberados contienen la proteína M no clivada (partículas inmaduras). El virus sale del complejo de Golgi vía membrana celular, transportado en una vesícula secretora. La membrana de la vesícula secretora se fusiona con la membrana celular para liberar el virus al medio extracelular y así poder infectar otras células (Fischl y Bartenschlager, 2011).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

La proteína no estructural NS1 fue identificada por primera vez en 1970 como un antígeno soluble fijador de complemento (del inglés: SCF antigen) (Smith y Wright, 1985). El antígeno SCF, originalmente conocido como gp48 en base a su peso molecular, fue luego renombrado NS1, posterior a la secuenciación del genoma del virus de la fiebre amarilla (YFV) en 1985 y la localización del gen que codifica para esta primera proteína no estructural identificada de los flavivirus (Rice y cols., 1985).

El gen que codifica para la proteína NS1 posee 1056 nucleótidos de largo, los cuales codifican para un polipéptido de 352 aminoácidos, compartiendo un alto grado de homología entre los flavivirus (Mandl y cols., 1989; Wright y cols., 1989).

La proteína NS1 tiene un peso molecular de entre 46 y 55 KDa dependiendo de su estatus de glicosilación, contiene 12 residuos de cisteína los cuales forman 6 puentes disulfuro y 2 azúcares terminales en su extremo amino, en las posiciones 130 y 207 (Somnuk, 2011). La proteína NS1 existe en múltiples formas oligoméricas, encontrándose en diferentes locaciones celulares: asociada a membranas (mNS1), en compartimientos vesiculares dentro de la célula y en la superficie o secretada al medio en forma soluble (sNS1) (Mason, 1989; Smith y Wright, 1985; Westaway y Goodman, 1987; Winkler y cols., 1988).

2.1. Estructura de la proteína NS1

Utilizando una combinación de técnicas bioquímicas y estructurales para elucidar la organización y composición de la NS1 intracelular y liberada al sobrenadante de células infectadas con DENV, se evidenció que la NS1 que se encuentra asociada a membranas intracelulares es mayoritariamente dimérica y la forma secretada encontrada en el suero de los pacientes y en sobrenadantes de cultivos celulares se presenta en forma hexamérica (Winkler y col., 1989; Flamand y col., 1999). A partir de análisis generados de reconstrucciones 3D de imágenes de microscopía electrónica y criomicroscopía electrónica junto a la caracterización de las propiedades anfipáticas de la proteína NS1, se estableció que la forma hexamérica secretada de esta proteína es una partícula lipoproteica en forma de un barril abierto de 10 nm de diámetro, conformada por tres dímeros de la proteína con un canal central prominente rico en lípidos. Adicionalmente, análisis bioquímicos y de resonancia magnética nuclear de los componentes lipídicos de la NS1, revelan la presencia de triglicéridos unidos en un ratio equimolar con el protómero NS1, así como ésteres de colesterol y fosfolípidos, composición que evoca a la lipoproteína plasmática de alta densidad (HDL) (Gutsche y cols. 2011, Muller y cols. 2012).

Recientemente, Akey y cols (2014) dilucidaron la estructura cristalográfica del dímero y del hexámero de la proteína NS1. Ultraestructuralmente, describen que cada monómero de la NS1 se compone de tres dominios: a) el dominio “ β -roll” hidrofóbico central (1-29 a.a.) el cual estaría ubicado en la cara interior del hexámero, b) el dominio “wing” (38-151 a.a.) ubicado en la cara externa del hexámero y c) el dominio β -ladder, el cual contiene una extensa hoja plegada β en una cara y en la opuesta una estructura denominada “espagueti loop” (181-352 a.a.) también ubicado hacia el exterior del hexámero. Los segmentos intermedios (30-37 y 152-180 a.a.) forman un subdominio conector compuesto de 3 hojas β plegadas, que conecta al dominio wing al β -roll central y al β -ladder. (Fig. 1 y 2). Con base en la estructura de la NS1 y ensayos de mapeos de epítopes, se propone que la NS1 posee epítopes claves tanto para la asociación del dímero a membranas celulares como para establecer interacciones con el sistema inmune, lo cual sirve de base para elucidar los mecanismos moleculares así como funciones de la NS1.

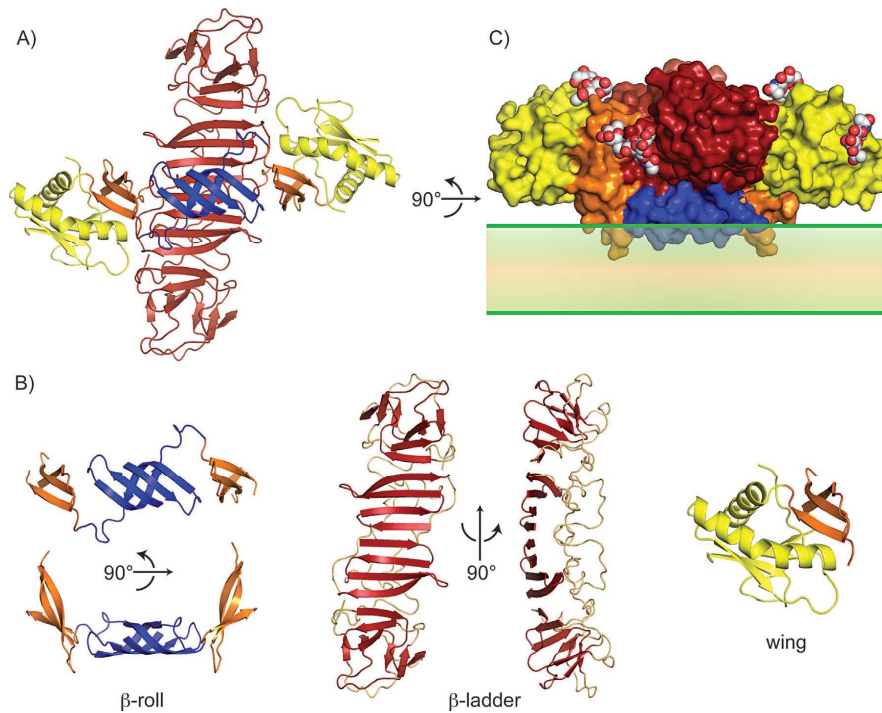


Fig. 1. Estructura del dímero de NS1. A) en azul: dominio β -roll, en amarillo: dominio wing, en rojo: dominio β -ladder. B) Representación de los tres dominios independientes. Izquierda: β -roll y subdominio conector (naranja), centro: β -ladder y "spaguetti loop", derecha: dominio wing, con subdominio conector. C) Superficie del dímero de NS1 con la cara interna orientada hacia la membrana (verde). (Tomado de Akey y cols., 2015)

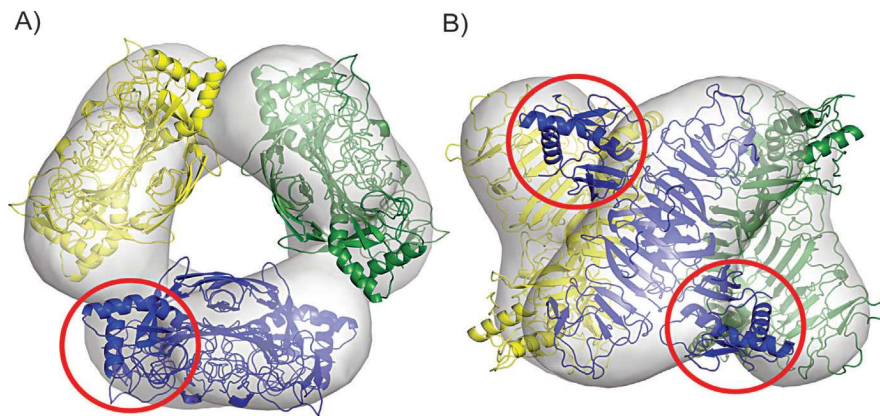


Fig. 2. Hexámero de NS1. A, B: vistas ortogonales de la estructura cristalográfica del hexámero de NS1 con superposición de los dímeros (amarillo, verde y azul) sobre mapas de obtenidos de criomicroscopía electrónica. En círculos rojos: dominios wing. (Modificado de Akey y cols., 2015). Nótese que no existen interacciones cercanas entre los tres dímeros que conforman el hexámero.

La proteína NS1 juega un rol importante como cofactor en la replicación viral y se ha evidenciado que colocaliza con ARN de doble cadena y otros componentes de los complejos de replicación viral (Mackenzie y cols., 1996; Westaway y cols., 1997). Aunque la función precisa de esta proteína en la replicación viral aún no se ha determinado, se presume que a través de su interacción con NS4A /NS4B y debido a su ubicación hacia el lumen del RER, NS1 actúa como proteína de andamiaje, necesaria para el asentamiento del complejo de replicación (Youn y cols., 2012). Adicionalmente, también se ha propuesto que la NS1 es requerida en pasos tardíos del ciclo de replicación viral debido a que su interacción con las proteínas estructurales E y preM en el lumen del RE es crucial para la generación de partículas virales infecciosas (Scaturro y cols., 2015).

Con base en diversos estudios enfocados a determinar con que proteínas celulares interacciona NS1, también se le han atribuido diversas funciones. En este sentido, se ha propuesto que la NS1 es un modulador importante del metabolismo energético celular, debido a que esta es capaz de interactuar con la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) in vitro e incrementar su actividad glicolítica (Allonso y cols., 2015). Recientemente se describió que la NS1 es capaz de interaccionar con al menos 64 proteínas de células hepáticas humanas (Huh-7) infectadas con DENV. Estas proteínas celulares con las que interacciona NS1, se encuentran implicadas en una variedad de procesos biológicos como la traducción, glicólisis, transporte, respuesta a estrés, entre otras. Como ejemplo de estas interacciones, se reportó que la ribonucleo proteína RPL18 juega un rol importante en la infección viral, ya que al ser silenciada se reduce significativamente la traducción, replicación y producción viral en células Huh-7 (Cervantes-Salazar y cols., 2015). Esta versatilidad de la NS1 de interaccionar tanto con proteínas virales como celulares, posiblemente facilite su plegamiento, tráfico o promueva un ambiente favorable para la producción viral en la célula huésped.

2.2 Expresión, procesamiento postraduccional y dinámica de la NS1

Una vez que el virus dengue entra a la célula huésped y se descapsida, el genoma viral provee el templado para una primera ronda de traducción de la poliproteína viral. La NS1, es traslocada dentro del lumen del RER mediante una secuencia señal

correspondiente a los últimos 24 aminoácidos de la proteína E (Falgout y cols., 1989) y es liberada de E en su porción amino terminal mediante el clivaje de peptidasas residentes en el RER (Nowak y cols., 1989). En su extremo carboxi terminal, la NS1 es clivada desde una secuencia de la proteína NS2A, por una proteasa residente en el RER aún no identificada (Falgout y Markoff, 1995). Se ha reportado que los últimos 8 aminoácidos (motivo octapeptídico L/M-V-X-S-X-V-X-A) de NS1 son necesarios como señal para el clivaje (Chambers y cols., 1990; Falgout y Markoff, 1995; Hora y Lai, 1990; Pethel y cols., 1992).

Una vez traducida, la NS1 es liberada de la poliproteína viral en forma de un monómero hidrofílico, el cual contiene 12 cisteínas que forman 6 puentes disulfuro, importantes tanto para la estructura como para la función de NS1 (Wallis y cols., 2004). Una vez clivada en el RE, la NS1 es glicosilada mediante la adición de residuos de manosa (Pryor y Wright, 1994; Winkler y cols., 1988). Estos monómeros hidrofóbicos rápidamente dimerizan (20-40 min) adquiriendo una naturaleza hidrofóbica parcial, como se demostró por la separación de la forma dimérica de NS1 tanto en membranas como en fase acuosa en experimentos de separación de fases utilizando Triton X-114 (Winkler y cols., 1989). Se ha demostrado que las formas multiméricas de la NS1 se forman espontáneamente en la ausencia de otras proteínas virales, indicando que la NS1 contiene toda la información necesaria para oligomerizarse (Parrish y cols., 1991; Pryor y Wright, 1993; Leblois y Young, 1995; Muller y cols., 2012).

Una vez que la NS1 se dimeriza, ocupa tres nichos separados en células de vertebrados: en los sitios de replicación viral dentro de la célula, en la superficie celular y secretada al espacio extracelular. La proteína NS1 que se asocia a la célula permanece como dímero y principalmente colocaliza con ARN de doble cadena y otras proteínas no estructurales, implicadas en la replicación genómica, en estructuras denominadas "paquetes vesiculares" (Mackenzie y cols., 1996), mientras que una pequeña proporción de NS1 se ubica en la superficie celular (Schlesinger y cols., 1990; Winkler y cols., 1989) y otra es secretada al medio.

2.3 Participación de la NS1 en la patología de la infección por DENV

La fuga de plasma y sangrados anormales, son dos de los principales signos patológicos de los pacientes que cursan las formas severas de la infección por dengue (FDH/SSD). Se ha descrito que los anticuerpos y las citoquinas que se producen en respuesta a la infección por DENV participan en la inmunopatogénesis, siendo aún poco conocida la participación de los factores virales. Sin embargo, se conoce que tanto la forma secretada de la proteína NS1 como la asociada a la superficie de la membrana plasmática son altamente inmunogénicas y tanto la proteína misma como los anticuerpos que se generan de ésta han sido implicados en la patogénesis de la enfermedad (Falgout y cols., 1990; Schlesinger y cols., 1987; Henchal y cols., 1988; Avirutnan y cols., 2006; Sun y cols., 2007).

Varios de los anticuerpos inducidos por NS1 presentan reacción cruzada con diferentes componentes relacionados con la coagulación como el plasminógeno humano, la trombina, las plaquetas y las células epiteliales (Falconar, 1997; Chuang y cols., 2011). Debido a que existe homología entre las secuencias de la NS1 del DENV, proteínas de células endoteliales y plaquetas es posible que estos anticuerpos anti-NS1 a través de mecanismos de mimetismo molecular puedan contribuir a establecer trombocitopenia, coagulopatía y fuga de plasma (Lin et al., 2011). Interesantemente, también se ha reportado que los anticuerpos anti NS1 son protectores contra la infección en ratones lactantes (Schlesinger y cols., 1987).

Por otra parte la La NS1 también puede mediar otros procesos que favorezcan la infección por mecanismos que no involucran anticuerpos. Por ejemplo, la NS1 soluble puede anclarse a la membrana plasmática y participar en mecanismos de traducción de señales que favorezcan la replicación viral (Jacobs et al., 2000) o unirse a la proteína C4b promoviendo su degradación y así evitar ser lisada vía complemento (Avirutnan et al., 2010; Avirutnan et al., 2011). Por otra parte, Beatty y cols (2015) demostraron que la NS1 soluble por si misma induce fuga de plasma promoviendo la disfunción de la barrera endotelial y la producción de citoquinas inflamatorias en un modelo murino. También evidenciaron que la NS1 desencadena la disfunción de la barrera endotelial, causando un incremento en la permeabilidad de monocapas de células endoteliales humanas in vitro. Adicionalmente, Modhiran y cols (2015) describen a la forma secretada de la NS1 como un patrón molecular asociado a patógenos (del inglés

PAMP) debido a que esta es capaz de activar macrófagos murinos y células mononucleares de sangre periférica humana (del inglés PBMCs) vía receptores tipo Toll 4 (TLR4), permitiendo la inducción y liberación de citoquinas y quimoquinas proinflamatorias. Estos resultados podrían explicar la asociación observada previamente entre altos niveles de NS1 circulante en el suero de pacientes y la severidad del cuadro clínico (Libraty y col., 2002; De la Cruz y col. 2013)

2.4 Secreción de NS1

En células de mamíferos, la NS1 también es transportada al Golgi mediante una vía secretora, en donde los motivos de carbohidratos son cortados y procesados en azúcares más complejos, para posteriormente ser secretada de la célula como un hexámero soluble, formado por 3 dímeros asociados (Crooks y cols., 1990, Crooks y cols., 1994, Flamand 1999, Gutsche y cols., 2011). Se ha evidenciado que tanto en células de vertebrados como de insecto, la NS1 adquiere oligosacáridos mediante N glicosilaciones, manteniendo oligosacáridos complejos de manosa por largo tiempo después de su síntesis. Sin embargo, el procesamiento y liberación de esta glicoproteína parece ser diferente en ambos modelos celulares.

Actualmente existen evidencias controversiales en relación a la secreción de la NS1 en células de insecto. Se ha reportado que las células de insecto C6/36 infectadas con el virus de la encefalitis japonesa o dengue, son incapaces de liberar NS1 al medio extracelular, mientras que las células Vero sí liberan NS1 al ser infectadas con el mismo virus y también con dengue (Mason, 1989; Leblais y Young, 1995, Flamand y cols., 1999). Estas diferencias, se han asociado a la inhabilidad de las células de mosquito para producir oligosacáridos complejos debido a que aunque el patrón de glicosilación de la NS1 intracelular en ambas líneas celulares es igual, la NS1 secretada de las células Vero contienen residuos de oligosacáridos más complejos (Mason 1989, Flamand y cols., 1999). Estos resultados llevaron a establecer la noción de que la proteína NS1 de dengue es secretada en células de vertebrados pero no en células de insecto.

Sin embargo, recientemente han aparecido estudios que reportan la secreción de NS1 en células C6/36 (Keelapang y cols., 2004; Ludert y cols., 2008; Ramírez y cols., 2010). Estos estudios encuentran altas cantidades de NS1 en el sobrenadante de células

infectadas a partir de las 12 horas post-infección. No obstante, dado los tiempos tardíos en que se midió la presencia de NS1 en el sobrenadante, cabe la posibilidad de que estos resultados se deban, no a la secreción de NS1, sino a la lisis de las células infectadas (Young y cols., 2012). Por otra parte, células de *Spodoptera frugiperda* infectadas con baculovirus recombinantes secretan NS1 de manera abundante (Leblois y Young, 1995, Muller y cols., 2012).

Se ha evidenciado que en células de vertebrados (BHK), la NS1 de dengue y del virus del oeste del Nilo (WNV) exhiben distintos patrones tanto en la membrana celular, como en la cantidad que es secretada al espacio extracelular. Así, la NS1 de WNV es más abundante en la membrana plasmática y contrariamente la NS1 de dengue es más abundante en el espacio extracelular. Con base en esto, se propuso que la NS1 de ambos virus pudiera presentar secuencias señales distintas que la direcciona de forma diferente hacia un espacio u otro. Para confirmar esto, se construyeron quimeras de NS1 de ambos virus y se identificó en la región C terminal de la secuencia de clivaje de la NS1, un motivo peptídico de dos aminoácidos (NK o RQ para dengue y WNV, respectivamente) ubicado en el aminoácido 10, como determinante en la modulación de los niveles de expresión de la proteína en membrana y de secreción en células BHK infectadas. Interesantemente, al reproducir los ensayos en células C6/36 con NS1 de WNV, ésta se detectó en el sobrenadante solo al insertarle los dos aminoácidos codificados por dengue, en la posición descrita (Youn y cols., 2010).

A pesar de que la NS1 de los flavivirus ha sido motivo de investigación durante dos décadas, aun se sabe poco acerca de su dinámica y función precisa tanto en células de vertebrado como de insecto. De hecho, NS1 es una proteína presente solo en aquellos flavivirus que utilizan insectos como vectores. La forma secretada de esta proteína ha sido implicada en una multitud de roles, que van desde promover una respuesta inmune protectora en individuos infectados, hasta su participación en la patogénesis de la enfermedad (Guzman y Harris, 2015; Avirutnan y cols., 2007). Sin embargo, muy poco se sabe de los mecanismos intracelulares de secreción. Actualmente las rutas de secreción interacciones huésped-patógeno durante el ciclo de replicación del virus dengue permanecen poco caracterizadas y los estudios en esta área se enfocan principalmente en los procesos de maduración del virión y menos en los mecanismos que soportan la secreción de NS1 (Kudelko y cols., 2011). Con base en lo expuesto, y

considerando la importancia de las implicaciones clínicas que se han atribuido a la NS1, se hacen necesarios estudios que contribuyan a elucidar la dinámica, los mecanismos y las interacciones que se llevan a cabo para que finalmente esta proteína pueda alcanzar el espacio extracelular.

3. JUSTIFICACION

La proteína no-estructural NS1 es una glicoproteína altamente conservada, presente solo entre los *Flavivirus* que utilizan insectos como vectores. En células de vertebrados NS1 se presenta en 3 formas discretas, asociada a membranas intracelulares, a la membrana plasmática y soluble. La forma intracelular es esencial para la viabilidad viral y las formas plasmáticas y solubles se han involucrado en protección y patogénesis. Sin embargo, poco se conoce del tráfico de NS1 en células infectadas y por lo tanto, se hace necesario su estudio. Además dada la participación de NS1 soluble en patogénesis, entender mejor su mecanismo de secreción podría crear oportunidades para el desarrollo de novedosos tratamientos para el dengue severo.

4. HIPOTESIS

Existen diferencias fundamentales en la dinámica de la proteína NS1 entre células infectadas de insectos y vertebrados.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la(s) ruta(s) de secreción de la proteína no estructural de dengue NS1 en células de invertebrados (C6/36) y de vertebrados (Vero).

Objetivos específicos:

1. Determinar si la proteína NS1 es secretada o no en células de insecto infectadas.
2. Estudiar las rutas de secreción de NS1 en células de invertebrados y compararla con la ruta de secreción en células de vertebrados.

3. Caracterizar las forma soluble de la proteína NS1 producida en células C6/36.

MATERIALES Y METODOS

1. Cepas Virales

La cepa 16681 del DENV serotipo 2, amablemente donada por el Dr. Richard Kinney (CDC, Fort Collins, CO) y la cepa 4H241 de DENV serotipo 4, se mantuvieron por inoculación en cerebros de ratones lactantes hasta evidenciar síntomas neurológicos a causa de la infección (parálisis, temblor fino en patas). Se hicieron extractos de cerebro de acuerdo a la metodología reportada por Gould y Clegg, (1991). Los títulos virales de los homogenados de cerebro de ratón y de todas los experimentos posteriores se determinaron mediante ensayo de placas en células BHK-21 siguiendo la metodología descrita en Líder y col. (2008).

2. Cultivos celulares

Las células C6/36 HT, derivadas de *Aedes albopictus*, adaptadas a crecer a 34°C, generosamente donadas por el Dr. Goro Kuno (CDC, Puerto Rico), se crecieron a 34°C en medio MEM, suplementado con 7% de suero fetal bovino fetal, aminoácidos no esenciales, vitaminas, 0.370 g/l de bicarbonato de sodio, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Las células Aag2, derivadas de *Aedes aegypti* (Lan and Fallon, 1990), gentilmente donadas por la Dra. Isabel Salazar (Instituto Politécnico Nacional, México), se crecieron en medio Schneider's suplementado con 7% de suero bovino fetal (Invitrogen), 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin a 28°C . Las células Vero se crecieron en medio Dulbecco's Eagle modificado (D-MEM Advanced GibcoRL) suplementado con 8% de suero bovino fetal (Gibco-BRL), 2 mM L-glutamina, 1.5 g/l de bicarbonato de sodio, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Las células BHK21 se crecieron en medio mínimo esencial (MEM, Gibco-BRL) suplementado con 10% de suero bovino fetal (GIBCO-BRL), 2 g/l de bicarbonato de sodio, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Las células Vero y BHK-21 se mantuvieron a una atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

3. Determinación de las concentraciones de NS1

Para la determinación de los niveles de NS1 en sobrenadantes de células infectadas, se utilizó el estuche comercial Platelia™ NS1 Ag (Bio-Rad, Hercules, CA) utilizado según las instrucciones del fabricante. Este es un método de ELISA sándwich que emplea un anticuerpo monoclonal adherido a la placa de ensayo el cual es capaz de reconocer de manera específica cualitativa o semicuantitativamente a la proteína NS1 de los cuatro serotipos del virus dengue. Aunque esta es una prueba diagnóstica destinada al uso de suero en pacientes, ha sido adaptada para la detección de NS1 en sobrenadantes de cultivos y en mosquitos infectados (Ludert y cols., 2008; Vogue y cols., 2013).

4. Infecciones virales:

Todas las infecciones virales se llevaron a cabo utilizando los serotipos DENV2 o DENV4 a una multiplicidad de infección (MOI) de 3, de la siguiente manera: Se retiró el medio de crecimiento de las células a infectar, se lavó una vez con medio Hank's (GIBCO), se adicionó el inóculo viral incubándose durante 1h a la temperatura de crecimiento de la línea celular, se retiró el inóculo y se lavó 2 veces la monocapa con medio Hank's, se adicionó medio de mantenimiento suficiente para cubrir la monocapa y se incubó a la temperatura de crecimiento durante el tiempo requerido para cada experimento. Concretamente, para las cinéticas de secreción de la proteína NS1, el sobrenadante y los lisados de las células C6/36HT, Aag2 o Vero infectadas con el virus DENV2 o DENV4 a una MOI de 3 fueron cosechadas a 3,6,12 y 24 hpi.

4. Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular de las monocapas celulares controles, post infecciones y/o tratamientos se determinó por diferentes métodos, unos dirigidos a la cuantificación de células muertas y otros a la determinación de células vivas.

4.1 Azul de tripano: las monocapas celulares se resuspendieron en PBS y se diluyeron 1:2 en la solución azul tripano (0,4% de Azul Tripano en PBS). Luego de 5 minutos de incubación se tomó una alícuota de 10 ul de la suspensión y se cargó este volumen en una cámara de Neubauer para el conteo de células vivas sin colorante y muertas (azules). La viabilidad se expresó como el porcentaje de células vivas en relación al total de células contadas.

4.2 Rojo Neutro: Al tiempo requerido post infección y/o tratamiento de las monocapas celulares, se adicionó una solución de medio de crecimiento específico de cada línea, adicionado con rojo neutro (100 µg/ml, pH 6.35) para cubrir la monocapa. Luego de 2 horas de incubación con la solución, para permitir la incorporación del rojo neutro en las células vivas, se realizaron dos lavados con PBS y se adicionó el medio de elución (étanol-ácido acético 50-1), incubándose las monocapas en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Alícuotas de las soluciones resultantes se transfirieron a multiplacas de 96 pozos y se midió la absorbancia a 540 nm. Para la determinación de los valores de porcentaje de viabilidad (%V), se aplicó la siguiente formula:

$$\%V = 100 - \frac{\text{D.O. (condición experimental)}}{\text{D.O. (control células sin tratar)}}$$

La viabilidad celular por este método se reportó restando 100 - %V.

4.3 MTT: Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Para la medición de esta enzima se utilizó el estuche comercial CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega), en el cual se añade el compuesto directamente sobre las monocapas celulares, se incuban las células a la temperatura de crecimiento durante 1h para luego leer la absorbancia a 490 nm en una placa de 96 pozos. El color generado es indicio de la cantidad del producto formazan generado, el cual será directamente proporcional al número de células vivas en la monocapa. Los porcentajes se expresan como % utilizando células no tratadas y células tratadas con Triton X-100 para establecer los valores máximos y mínimos de O.D.

4.4 LDH: La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citotóxica soluble que es liberada al medio de cultivo cuando hay pérdida de la integridad de la membrana celular producto de procesos de apoptosis o necrosis. La actividad de la LDH puede utilizarse como un indicador de la integridad de la membrana y sirve como un

indicador de viabilidad celular luego de tratamientos con compuestos químicos o factores tóxicos. Para la determinación de esta enzima como indicador de viabilidad celular se utilizó el estuche comercial LDH Cytotoxicity Assay Kit (Cayman Chemical), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las determinaciones de absorbancias se realizaron a 490 nm en un espectrofotómetro (ELx808, USA). El nivel de formazan detectado colorimétricamente es directamente proporcional a la cantidad de LDH liberada al medio lo cual es indicativo de toxicidad. Los valores de viabilidad para esta prueba se establecieron tomando como 100% de viabilidad a las lecturas de los sobrenadantes de las monocapas celulares sin infectar.

4.5 Sytox: El colorante (SYTOX® Orange Nucleic Acid Stain (Life Technologies) es capaz de unirse a ácidos nucleicos en células con membrana plasmática comprometidas. La detección de este colorante es un indicador de muerte celular más brillante que el Ioduro de propidio clásicamente utilizado. Luego de una incubación de 15 min con el SYTOX®, el porcentaje de células muertas se midió por citometría contando 10.000 eventos y empleando el espectro de excitación a 633 nm en un citómetro de flujo (Calibur, BD). El porcentaje de células vivas se determinó como el porcentaje de células no marcadas en relación al total de células contadas.

5. Microscopía Electrónica:

Para la localización de la proteína NS1 en células C6/36HT por inmunomicroscopía electrónica, se infectaron con DENV4 monocapas confluentes crecidas en multicajas de 6 pozos a una MOI=3. Las monocapas se fijaron a 3, 6, 12, y 24 hpi con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.1%, y se deshidrataron mediante gradiente de etanoles. Las células se despegaron de la multicaja mediante tratamiento con óxido de propileno (Polysciences Inc., Warrington, PA), cortando los bordes de la monocapa con un cuchillo y levantando la monocapa con una espátula. Las monocapas despegadas se colectaron en microtubos de 1.5 ml y lavadas 2 veces con un exceso de óxido de propileno para remover cualquier resto de plástico. Las muestras fueron embebidas en resina LR (Polysciences Inc., Warrington, PA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se cortaron en secciones finas de 60 nm con un cuchillo de diamante y colocadas sobre rejillas de níquel de 200-mesh recubiertas con una película de formvar. Para bloquear sitios inespecíficos de unión a anticuerpos, se hicieron flotar las rejillas en 10% de suero fetal bovino en PBS durante 1h.

Posteriormente las rejillas fueron incubadas sobre gotas de una dilución 1:30 de un suero hiper-immune de conejo anti-NS1 (donado por el Dr. Ronaldo Mohana, Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil) a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, las rejillas fueron lavadas 5 veces en PBS e incubadas durante 1h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a nanopartículas de oro e 10 nm (Ted Pella, Redding, CA) diluido 1:60 en PBS. Como controles de la especificidad de la marca de las partículas de oro, se incubaron células infectadas y fijadas a 24 hpi directamente con el anticuerpo secundario omitiendo al anticuerpo primario anti NS1 y también se incubaron células no infectadas con los anticuerpos primario y secundario. Finalmente, se contrastaron las preparaciones con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron a 80 kV en un microscopio Jeol modelo JEM-1011 electron microscope (Jeol Ltd., Tokyo, Japan).

Para visualizar los oligómeros de NS1, se concentraron sobrenadantes cosechados a 24 hpi de células C6/36HT infectadas con DENV4 a una MOI=3, mediante centrifugación a 5000xg durante 30 min a 4°C, en unidades de filtración con un valor de corte de 30 KDa (Ultracel® 30K, Millipore, Cork, Ireland). Alícuotas de 20 µl del material concentrado, fueron colocadas sobre rejillas cubiertas con carbón coloidal, teñidas negativamente con acetato de uranilo al 2% y examinadas en el microscopio electrónico a 80kV.

6. Microscopía de Fuerza Atómica

Para analizar la estructura de los oligómeros de la proteína NS1 mediante microscopia de fuerza atómica (AFM), se dejaron secar 20 µl de sobrenadantes cosechados a 24 hpi. y concentrados en las unidades de filtración de células C6/36 infectadas o no, sobre láminas portaobjetos de vidrio y se escanearon en modo de contacto bajo el microscopio de fuerza atómica (Autoprobe CP Research, Thermo-microscopes). El microscopio se equipó con un escáner de 5µm y una punta de 100 Å de nitruro de silicio, colocada sobre un ultralevel de 0.6 µm modelo ULCT-AUMT. Se utilizó una tasa de scan de 2-3 Hz, una fuerza de 10 nM y una ganancia de 0.5 unidades arbitrarias. El análisis de las imágenes, la altura de los perfiles y el diámetro de las estructuras se determinaron utilizando el programa proscan (versión 1.5, Park Scientific Instruments, 1997).

7. Ensayos de Inmunofluorescencia:

Las células C6/36 o Vero se crecieron sobre cubreobjetos de 13 mm de diámetro, los cuales fueron colocados en placas de 24 pozos. Una vez que las células alcanzaron la confluencia necesaria, se aplicó el tratamiento necesario (infección y/o transfección). A diferentes tiempos post condición, las células se fijaron y tiñeron para inmunofluorescencia como se describe a continuación: la monocapa celular se lavó dos veces con PBS y se fijó durante 20 minutos con paraformaldehído al 4% (Merk). Una vez fijada, la monocapa se lavó 3 veces con PBS y las células se permeabilizaron o no según la necesidad del experimento, con acetona fría durante 5 minutos. Posterior a 3 lavados con PBS, las células se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (10% SBF, 3% BSA, 10 mM glicina en PBS). Las células se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución diluyente (3% SBF, 1% BSA, 10 mM glicina en PBS) durante toda la noche a 4°C. Posterior a 5 lavados con PBS, las células se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa diluido en solución diluyente. Al momento del montaje de las laminillas se añadió directamente al portaobjeto el compuesto DAPI para teñir núcleos. Las laminillas invertidas se fijaron con esmalte de uñas previo a su visualización en el microscopio confocal (Carl Zeiss AG, Jena, Germany). Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa ZEN lite 2012 (Carl Zeiss AG, Jena, Germany).

La tabla 1 muestra los anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia y sus diluciones de uso.

Para los experimentos de colocalización entre la proteína NS1 y CAV1 en células de insecto, las células fueron procesadas a las 6, 12 y 24 hpi según el protocolo descrito. El porcentaje de colocalización entre ambas proteínas se analizó empleando el programa del equipo (ZEN lite).

8. Rutas de secreción de NS1

Para evaluar la ruta de secreción de la proteína NS1 se utilizaron dos aproximaciones: el uso de las drogas brefeldina A (BFA) y β metil ciclodextrina (BMCD) y el uso de siRNAs contra SAR1 y CAV1. La BFA tiene un efecto inhibitorio sobre la ruta clásica de secreción de proteínas celulares y la BMCD secuestra e inhibe la secreción de colesterol. SAR1 es una proteína implicada en la ruta secretoria clásica y CAV1 es una

proteína que participa en la vía de secreción de colesterol como parte del complejo chaperon de caveolina (CCC).

8.1 Experimentos con BFA: Se infectaron monocapas de las líneas celulares C6/36HT, Aag2 o Vero, crecidas en multiplacas de 24 pozos a un 80% de confluencia, con DENV 4 o DENV2 a una MOI=3. A las 6 hpi, se retiró el sobrenadante y se adicionó medio de crecimiento nuevo contentivo de la droga a diferentes concentraciones (C6/36HT y Aag2: 7µg/ml, Vero: 1µg/ml), las cuales fueron ensayadas previamente en una curva de viabilidad y seleccionadas por no causar efecto citotóxico sobre las monocapas. A 24 hpi, se retiró el sobrenadante de cada condición para la medición de los niveles de la proteína NS1 presente en los sobrenadantes por ELISA y para la determinación de la progenie viral por ensayo de placa. En algunos casos la monocapa se utilizó para la determinación de la viabilidad celular por ensayos con azul tripano o rojo neutro.

8.3 Experimentos con BMCD: Se infectaron monocapas de células C6/36HT crecidas en multiplacas de 24 pozos a un 80% de confluencia, con DENV 4 a una MOI=3. A las 6 hpi, se retiró el sobrenadante y se adicionó medio de crecimiento nuevo contentivo de la droga BMCD a diferentes concentraciones (3,6 y 9 mM). A 24 hpi se colectaron los sobrenadantes para la medición de los niveles de NS1 y la determinación del título viral por ensayos de placa. Las monocapas celulares se utilizaron para determinar los niveles de viabilidad empleando el estuche comercial MTT.

8.2 Ensayos de silenciamiento de genes: Para los ensayos de silenciamiento de los genes codificantes para las proteínas caveolina 1 o SAR 1 en células C6/36HT se procedió de la siguiente manera: 24 horas antes de la transfección se sembraron 2×10^5 células/pozo en multicajas de cultivo de 24 pozos en 500 µl de medio MEM (Gibco) con suero fetal bovino, antibióticos y se incubaron a 34°C. Luego de este tiempo se diluyeron los siRNA para CAV-1 o SAR1 (Qiagen) hasta una concentración de 10 nM en medio de crecimiento sin suero, se adicionaron 2 µl del reactivo Hiperfect Transfection reagent (Qiagen) por cada 100 µl de la dilución de siRNA, la mezcla se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos lípido-siRNA. Posterior a la incubación se retiró el medio de crecimiento de las monocapas y se adicionaron 300 µl de la mezcla a cada pozo, las

células se incubaron nuevamente a 34 °C hasta el tiempo requerido para monitorear el silenciamiento de genes por western blot o inmunofluorescencia (de 12 a 72 h.p.t.). El medio de mantenimiento se cambió cada 24 horas de acuerdo a los requerimientos del cultivo.

9. Ensayos de Western Blot:

La naturaleza oligomérica de la proteína NS1 secretada se determinó por ensayos de western blot según el protocolo descrito por flamand y col. (1999). Se colectaron sobrenadantes desde células infectadas o no y se concentraron por centrifugación a 5000g durante 30min a 4°C en unidades de filtración de 100K (Ultracel®, Millipore, Cork, Ireland). Los filtros de 100K se utilizaron para eliminar la albumina presente en el suero fetal bovino utilizado en el medio de crecimiento celular, la cual se comporta como un potente inhibidor de las reacciones de entrecruzamiento. Los entrecruzamientos químicos se llevaron a cabo con DSG (disuccimidil glutarato, brazo espaciador 7.7Å, Thermo Scientific). Las reacciones se incubaron a 37°C durante 60 min y se bloqueó con Tris (50 mM, pH 8.0) durante 15 min. Se analizaron sobrenadantes de células Vero infectadas o no como controles. Las muestras se separaron en geles de acrilamida en gradiente del 5 al 10%, en ausencia de calor desnaturizante y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de acuerdo a protocolos estándar. La presencia de la proteína NS1 se evidenció utilizando un anticuerpo comercial policlonal anti-NS1 (Sigma Aldrich) y un anticuerpo secundario IgG anti-conejo acoplado a peroxidasa (Cell Signaling Technologies). Las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia (Supersignal® West Pico, Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El silenciamiento de CAV1 se evidenció mediante electroforesis en geles de acrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes y western blot de acuerdo a protocolos estándares.

La tabla 1 muestra los distintos anticuerpos y diluciones de uso tanto para ensayos de western blot como para ensayos de inmunofluorescencia.

Tabla 1.- Concentraciones de anticuerpos utilizadas para ensayos de inmunofluorescencia o Western Blot.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución Western Blot	Dilución Inmunofluorescencia
Anti cav-1	Thermo Scientific (Rockford USA)	1:2000	1:100
Anti sar1	Thermo Scientific	1:500	1:100
Anti Actina	Donado por Dr. Manuel Hernández (Cinvestav)	1:3000	-
Anti Ratón IgG	Abcam	1:15.000	1:200
Anti Conejo IgG	Abcam	1:8.500	1:200
Anti Chivo	Abcam	1:30.000	1:200

10. Ensayos de Citometría

La presencia de NS1 en la superficie de células C6/36HT infectadas se evaluó por citometría de flujo. Para ello, se crecieron células C6/36 o Vero en multicajas de 24 pozos, se infectaron con DENV4 a una MOI=3. Las monocapas celulares se despegaron 24 hpi. con la ayuda de un rascador de goma o con tripsina, en el caso de las células C6/36HT y Vero respectivamente. Las monocapas se trasvasaron a microtubos de 1,5 ml de capacidad y se fijaron en suspensión con paraformaldehído al 1% en PBS durante 20 min a ta. Las células a permeabilizar se incubaron durante 20 min con una solución permeabilizadora (saponina 0,1% y SFB 1% en PBS). Posteriormente, se incubaron con suero hiperinmune de conejo anti-NS1 (dilución 1:100) en solución diluyente (PBS, SFB 1%) durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron con 500 µl de PBS y se incubaron con anti IgG de conejo conjugado a Alexa 488. Las células se lavaron una vez más con PBS y se resuspendieron en 300 µl de PBS. Los ensayos se realizaron por triplicado y se leyeron en el equipo BD LSR Fortessa cuantificando 10.000 eventos en cada uno. Los resultados fueron procesados y analizados utilizando el programa Flowjow.

11. Análisis de secuencias genómicas

Para evaluar la presencia, conservación y localización de los dominios de unión a CAV1 (CBD) en las secuencias aminoacídicas de la proteína NS1 de los diferentes serotipos de DENV se hicieron alineamientos en formato CLUSTAL W empleando los programas DNAMAN 5.2.2 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canadá) y el programa MEGA versión 4.1. Las secuencias de NS1 se tomaron directamente del Genbank (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y el número de acceso de las secuencias se muestra directamente en la figura.

12. Metodología Computacional

Para evaluar la posibilidad de interacción entre las proteínas CAV1 y NS1, se llevaron a cabo análisis *in silico*, utilizando 2 diferentes metodologías mecánica clásica y XXXXX. Para ello, se modelaron inicialmente las siguientes estructuras: a) región en la secuencia de CAV1 correspondiente al Caveolin-1 Scaffolding Domain (CSD) (82 DGIWKASFTTFTVTKYWFYR 101 a.a.), b) región en la secuencia de la NS1 que contiene el Dominio de unión a CAV1 (CBDNS1) (158-172 a.a.). Así mismo se tomó de la base de datos de estructuras de proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) el modelo 3D completo de las proteínas NS1 y NS3c (números de acceso: 117727 y 60353 respectivamente). Hasta la fecha la estructura 3D de la proteína CAV1 aún no ha sido modelada.

Para la optimización geométrica de cada estructura molecular se utilizó el Módulo Discover disponible en el programa Material Studio (Accelrys Inc., San Diego) con el Campo de Fuerza Universal. Las fuerzas electrostáticas y de van der Waals se determinaron mediante los métodos Ewald summation con una especificidad de 0.001 kcal/mol utilizando un valor de corte de 6 Å y un ancho de buffer de 0.5 Å.

El cálculo del parámetro de interacción Flory-Huggins que describe la miscibilidad de mezclas de polímeros, se determinó mediante la metodología de Belmares y col. (2004) y se llevó a cabo utilizando el módulo de Blends disponible en el programa Material Studio empleando el Campo de Fuerza COMPASS (Sun, H., 1998). Todas las simulaciones se corrieron a 298°K.

La energía de interacción (E_{int}) fue definida como:

$$E_{int} = E_{dimer} - (E_{protein} + E_{Scaffolding})$$

Donde:

E_{int} : energía de interacción calculada.

E_{dimer} : energía de interacción de la proteína de interés con el CSD

$E_{protein}$: energía de la proteína de interés en fase gaseosa

$E_{Scaffolding}$: la energía del CSD

En base a estos parámetros una E_{int} negativa corresponderá a una interacción estable de las proteínas modeladas.

13. Análisis Estadísticos: El programa Excel se utilizó para la realización de las gráficas y análisis estadísticos. Los valores en las gráficas se presentan como el promedio \pm la desviación estándar. Los valores se analizaron utilizando la prueba de Anova de 1 cola y valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente seignificativos.

RESULTADOS

La proteína NS1 es secretada por células de insecto.

Para determinar los tiempos de aparición de la proteína NS1 en sobrenadantes de células de insecto C6/36 HT y Aag2 infectadas con DENV2 o DENV4, se evaluó la presencia de NS1 soluble utilizando el estuche comercial PLATELIA™ NS1 AG en sobrenadantes de células infectadas cosechados a las 3, 6, 12, 24 hpi. En paralelo se infectaron células Vero para comparación de las cinéticas. Se evidencia que a partir de las 6 hpi hay presencia de NS1 tanto en sobrenadantes de células C6/36HT como de Aag2, la cual va incrementándose en el transcurso de la infección con ambos serotipos (Fig. 2, paneles A y B). Sin embargo, el patrón de secreción muestra diferencias en las concentraciones de NS1 en relación al serotipo infectante. En células Vero, se observa también la secreción de NS1 pero con una marcada diferencia en la cinética ya que la proteína NS1 es detectable solo a partir de las 12 hpi. (Fig. 2, panel C). Repetición de estos experimentos en células C6/36 normales crecidas a 28°C e infectadas con DENV4, generaron resultados similares (datos no mostrados). Estos resultados indican que efectivamente hay presencia de la NS1 en los sobrenadantes aunque el patrón de secreción presenta diferencias entre serotipos infectantes y entre líneas celulares.

Secreción de la proteína NS1 en ausencia de lisis celular

La proteína NS1 es detectada en el sobrenadante de cultivos de células de insecto desde tiempos tempranos post-infección. Sin embargo, existe la posibilidad de que su presencia se deba a lisis celular y no a un proceso de secreción (Muller y Young, 2013). Para descartar esta posibilidad, se evaluó la viabilidad de las monocapas a varios tiempos post-infección en las 3 líneas celulares infectadas. Utilizando varios métodos de determinación de la viabilidad, los resultados muestran porcentajes de viabilidad entre un 95 y 99% a 24 hpi, independientemente del método utilizado (Tabla 2), lo cual sugiere que la presencia de NS1 en el sobrenadante no se debe a un proceso de lisis celular. De igual manera, la viabilidad observada a las 24 hpi de células C6/36 silvestres infectadas con DENV, también resultó ser superior al 90% (datos no mostrados).

Debido a que la presencia de la proteína NS1 soluble es detectada en células C6/36HT infectadas a partir de las 6 hpi y ocurre un aumento progresivo de concentración hasta las 24 hpi, se razonó que si la presencia de NS1 es debida a lisis o muerte celular, se debería detectar una disminución progresiva de la viabilidad celular durante el curso de la infección. Para evaluar esto, realizamos pruebas de viabilidad a las 3, 6, 12 y 24 hpi, las cuales arrojaron porcentajes de viabilidad similares a los establecidos a las 24 hpi (Tabla 3). La disociación entre la presencia de NS1 en sobrenadante y muerte celular indica que la presencia de la proteína NS1 en sobrenadantes se debe a procesos de secreción.

Para corroborar la eficiencia de la infección, además de los niveles de NS1 soluble, también se determinó la progenie viral generada a 24 hpi en las 3 líneas celulares mediante ensayo de placas; los cuales promediaron 2×10^4 , 1×10^4 y 1×10^5 UFP/ml para la células C6/36HT, Aag2 y Vero, respectivamente.

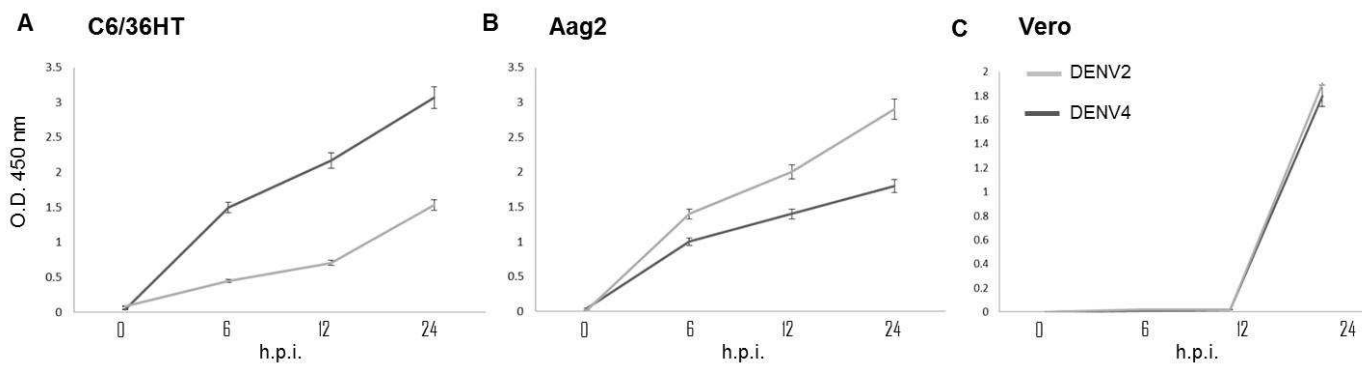


Figure 2. Presencia de la proteína NS1 en sobrenadantes de células de mosquito y vertebrados infectadas con DENV. Células C6/36HT (A), células Aag2 (B) y células Vero (C) fueron infectadas con DENV2 o DENV4 a una MOI=3. Los sobrenadantes celulares se colectaron a diferentes tiempos post infección y la presencia de NS1 se determinó utilizando un ELISA comercial. $n \geq 3$.

Tabla 2.- Viabilidad en células infectadas con DENV a 24

	TRYPAN BLUE	NEUTRAL RED	MTT (PIERCE)	LDH (ROCHE)	SYTOX (INVITROGEN)
C6/36HT (D4)	98±1	97±2	98±1	95±2	95±3
C6/36HT (D2)	98±1	96±1	97±1	95±1	ND
Agg2 (D4)	97±1	95±1	96±1	ND	ND
Agg2 (D2)	97±1	96±1	96±1	ND	ND
Vero (D4)	98±2	97±1	98±1	96±1	ND
Vero (D2)	98±2	97±1	97±1	96±1	ND

Tabla 3.- Viabilidad de células C6/36HT infectadas con DENV4

Method h.p.i.	TRYPAN BLUE	NEUTRAL RED	LDH
3	98.5 ± 0.4	98 ± 0.5	99 ± 1
6	98.7 ± 0.5	97 ± 0.5	98.5 ± 0
12	98.8 ± 0.5	97 ± 1	98.5 ± 0
24	98 ± 1	97 ± 2	98 ± 0.5

La proteína NS1 no se asocia a la membrana plasmática de células de mosquito infectadas.

Se ha establecido, que aparte de su localización intracitoplasmática, la proteína NS1 también se asocia a la cara externa de la membrana plasmática de células de vertebrados infectadas con flavivirus (Avirutnan y col., 2007; Muller y Young, 2012). Para corroborar si esta localización de la NS1 también se repite en células de insectos, se fijaron células C6/36HT a 24 hpi y se observaron al microscopio confocal, posterior al tratamiento de permeabilización con acetona o no. En células permeabilizadas, la NS1 se observó en el citoplasma. Sin embargo, no se evidenció señal específica de la proteína en las células no permeabilizadas marcadas con un suero hiperinmune específico anti-NS1 (Fig. 3, panel A). En contraste, en células Vero permeabilizadas o no, utilizadas como control, si se evidenció señal específica para la proteína NS1 (Figure 3, panel B). Estos resultados sugieren que la proteína NS1 no se asocia a la cara externa de la membrana plasmática de células de mosquito.

La presencia de NS1 sobre la cara externa de la membrana plasmática de células C6/36HT infectadas, también fue analizada mediante citometría de flujo en células colectadas a 24 hpi y en células Vero para establecer comparaciones. En concordancia con los datos obtenidos por microscopía confocal, se observó una señal débil por encima de los niveles de fondo en la superficie de las células C6/36HT infectadas no permeabilizadas, sugiriendo la ausencia de NS1 sobre la cara externa de la membrana plasmática. En contraste y como se esperaba, si se detectó fluorescencia en la superficie de células Vero no permeabilizadas y en ambas líneas celulares permeabilizadas (Fig. 4).

Para corroborar los datos obtenidos de la microscopía confocal y la citometría de flujo, se evaluó también mediante inmuno-microscopía electrónica la asociación de la NS1 a la membrana plasmática de células de insecto infectadas. Para ello, se fijaron células C6/36HT a 6, 12 y 24 phi. En las células infectadas, se observaron alteraciones de estructuras membranales como formación de vesículas y aglomeración de estas en concordancia con estudios anteriores (Mackenzie y col., 1996; Junjhon y col., 2014). La proteína NS1 se evidenció en el citoplasma de las células infectadas fijadas a las 6, 12 o 24 phi. (Fig. 5, paneles A, B y C). La proteína NS1 está presente en el citoplasma asociada a vesículas membranales, dentro de estructuras tipo vacuolas y en el núcleo.

La ubicación de la NS1 en estructuras tipo vacuolas fue más evidente a las 24 phi; sin embargo, no se observaron partículas de oro en la superficie de las células, lo que sugiere que la NS1 no se asocia con la membrana plasmática en células de insecto infectadas. La especificidad de la marca de oro se corroboró utilizando células no infectadas tratadas con ambos anticuerpos y en células infectadas en las cuales se omitió el anticuerpo primario (Fig. 5, paneles D y E).

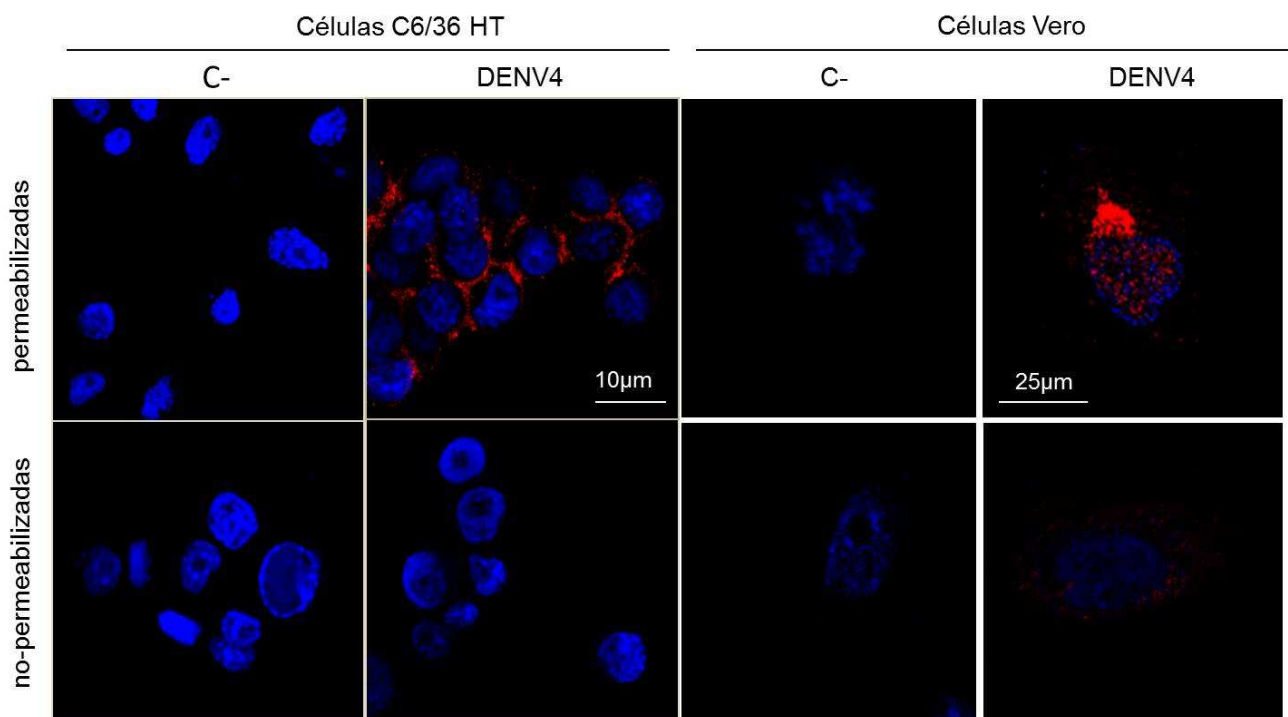


Figura 3. Microscopía confocal de células C6/36HT y Vero infectadas con DENV. Se infectaron células C6/36HT y Vero con DENV4 a una MOI=3. Las células se fijaron a 24 hpi, se permeabilizaron o no con acetona y se marcaron para la detección de NS1 utilizando un suero hiperinmune de conejo como anticuerpo primario y con un anti-conejo conjugado con Alexa 647 como anticuerpo secundario. Células no infectadas se tiñeron como controles negativos (C-). Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI.

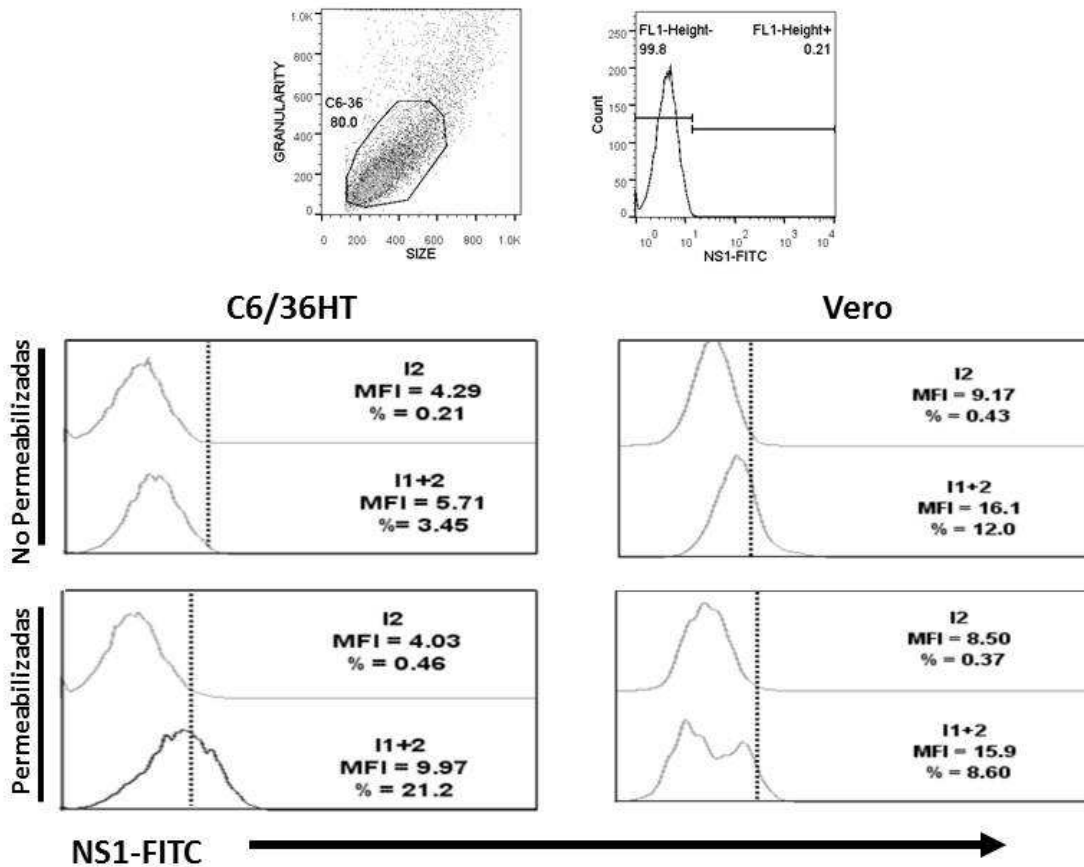


Figura 4. Citometría de células C6/36HT y Vero Infechadas con DENV. Se infectaron monocapas confluentes de células C6/36HT y Vero con DENV4 (MOI=3), se fijaron a 24 hpi con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron o no con Triton X-100. Las suspensiones celulares se marcaron individualmente para la proteína NS1 utilizando un anticuerpo monoclonal comercial como anticuerpo primario y un anticuerpo IgG anti-ratón conjugado a FITC (1+2). Células incubadas solo con el anticuerpo secundario (2) incluidas como controles. En el panel superior derecho se muestran las condiciones de selección de la población de células y en el izquierdo la región utilizada para determinar la intensidad media de fluorescencia (MFI). En el panel inferior se muestran los histogramas para cada condición indicando la MFI y el porcentaje de células positivas.

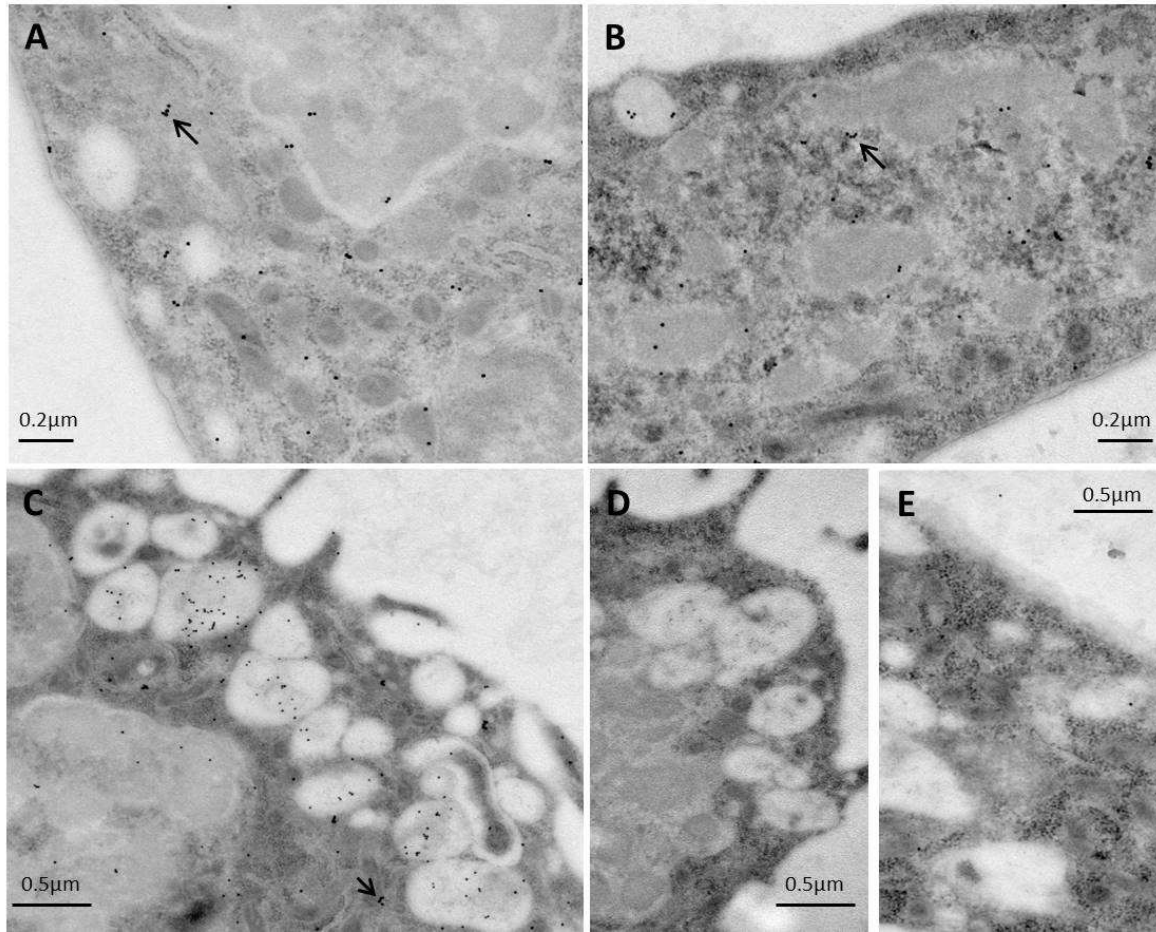


Fig. 5. Inmunomicroscopia electrónica de células C6/36HT infectadas con DENV. Las células C6/36HT se infectaron con DENV4 a MOI=3 y se fijaron a 6 (A), 12 (B) y 24 hpi (C). Las células se marcaron utilizando un suero hiperinmune anti-NS1 generado en conejo como anticuerpo primario y un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a partículas de oro de 10 nm. Células infectadas, fijadas a 24 hpi e incubadas directamente con el anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a partículas de oro de 10 nm (D) y células no infectadas incubadas con anticuerpos primarios y secundarios (E) se utilizaron como controles. Vesículas membranales inducidas por la infección se señalan con flechas sólidas.

La proteína NS1 secretada desde células C6/36 es hexamérica y se asocia en estructuras en forma de barril.

La proteína NS1 secretada desde células infectadas de vertebrados y liberada a sangre de individuos infectados con dengue es un hexámero con forma de barril con un canal central (Flamand y col., 1999; Gutsche y col., 2011). También se ha descrito que la NS1 liberada de células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes conserva esta forma hexamérica (Muller y col., 2012). Para evaluar la naturaleza oligomérica de la de la forma secretada de la NS1 en sobrenadantes de células de insecto, se entrecruzaron preparaciones de sobrenadantes concentrados de células colectadas a 24 phi y analizadas mediante western blot (Figura 6). Se observaron bandas de pesos moleculares superiores a 250 kD y 100 kD, compatibles con las formas hexamérica y dimerica de NS1 respectivamente; estas bandas se observaron tanto en sobrenadantes de células C6/36 como de células Vero analizados en paralelo como control. Por otra parte, solo se observó una banda de 100 kD en las preparaciones no sometidas a entrecruzamiento, lo que está en concordancia con la naturaleza lábil de la forma hexamérica de la NS1 reportado en trabajos anteriores (Flamand y col; 1999). No se observaron bandas en los sobrenadantes de células no infectadas.

Con la finalidad de analizar la estructura de la NS1 liberada desde células de mosquito, se infectaron células C6/36HT y a las 24 phi, se recolectaron sobrenadantes y se concentraron mediante centrifugación a través de filtros. Se colectaron alícuotas de los concentrados y se tiñeron negativamente para ser visualizados mediante microscopia electrónica. Se observó la presencia de material particulado electron denso desde el sobrenadante concentrado desde células infectadas (Fig. 7, paneles B, C y D) mas no en el concentrado desde células no infectadas, las cuales se utilizaron como controles (Fig. 7, panel A). Luego de examinar exhaustivamente el material, se determinó que el diámetro de las partículas era de 10 nm y se apreciaron detalles ultra estructurales perfectamente compatibles con la conformación de barril descritos previamente como característicos de la forma hexamérica de la proteína NS1 (Fig. 7).

Finalmente, para corroborar estos resultados, el material concentrado también se analizó mediante microscopía de fuerza atómica (MFA). En los perfiles de altura de las muestras analizadas se evidencian estructuras con eje de simetría 3 y una depresión central (Fig. 8, panel A), así como también se evidenciaron estructuras alongadas con

contornos lobulares (Fig. 8, paneles B y C), ambas estructuras con aproximadamente 10nm de diámetro y semejantes a las reconstrucciones tridimensionales en eje de simetría 3 y 2 de la forma hexamérica de NS1 liberada desde células de vertebrados (Gutsche y col., 2011). Estas estructuras descritas no se evidenciaron en sobrenadantes colectados desde células no infectadas (Fig. 8, panel D). Los resultados obtenidos de los entrecruzamientos junto con los de microscopía electrónica y AFM, indican que la NS1 secretada desde células de insecto infectadas con DENV es hexamérica y presenta la forma de barril hueco como se reportó previamente para la NS1 secretada de células de vertebrados.

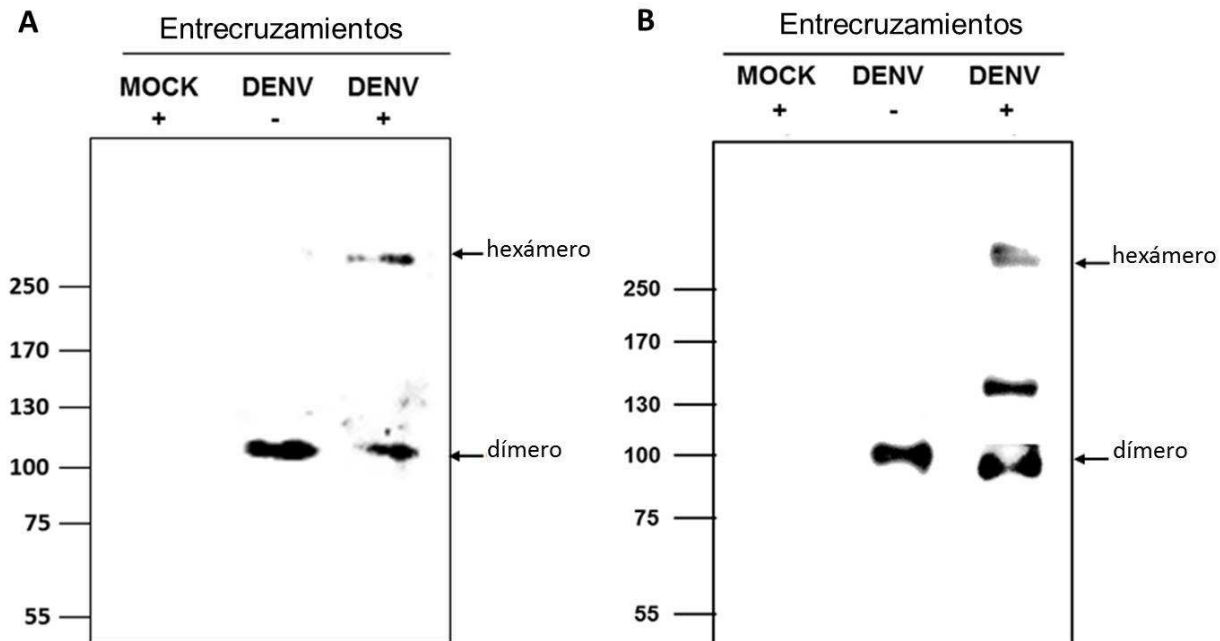


Figura 6. Entrecruzamiento de la proteína NS1 secretada desde células C6/36HT infectadas con DENV. Sobrenadantes concentrados de células C6/36HT (A) y Vero (B) infectadas o no con DENV se entrecruzaron con 50mM de DSG. Sobrenadantes concentrados desde células infectadas se incluyeron como controles. Las proteínas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida en gradiente del 5 al 10%, en condiciones no desnaturalizantes y visualizadas por western blot. Las bandas correspondientes a los hexámeros y dímeros de NS1 se indican. La banda adicional que se observa en los entrecruzamientos de sobrenadantes de células Vero puede corresponder a la forma tetramérica previamente reportada. Los marcadores de peso Molecular se indican en el lado izquierdo de cada panel.

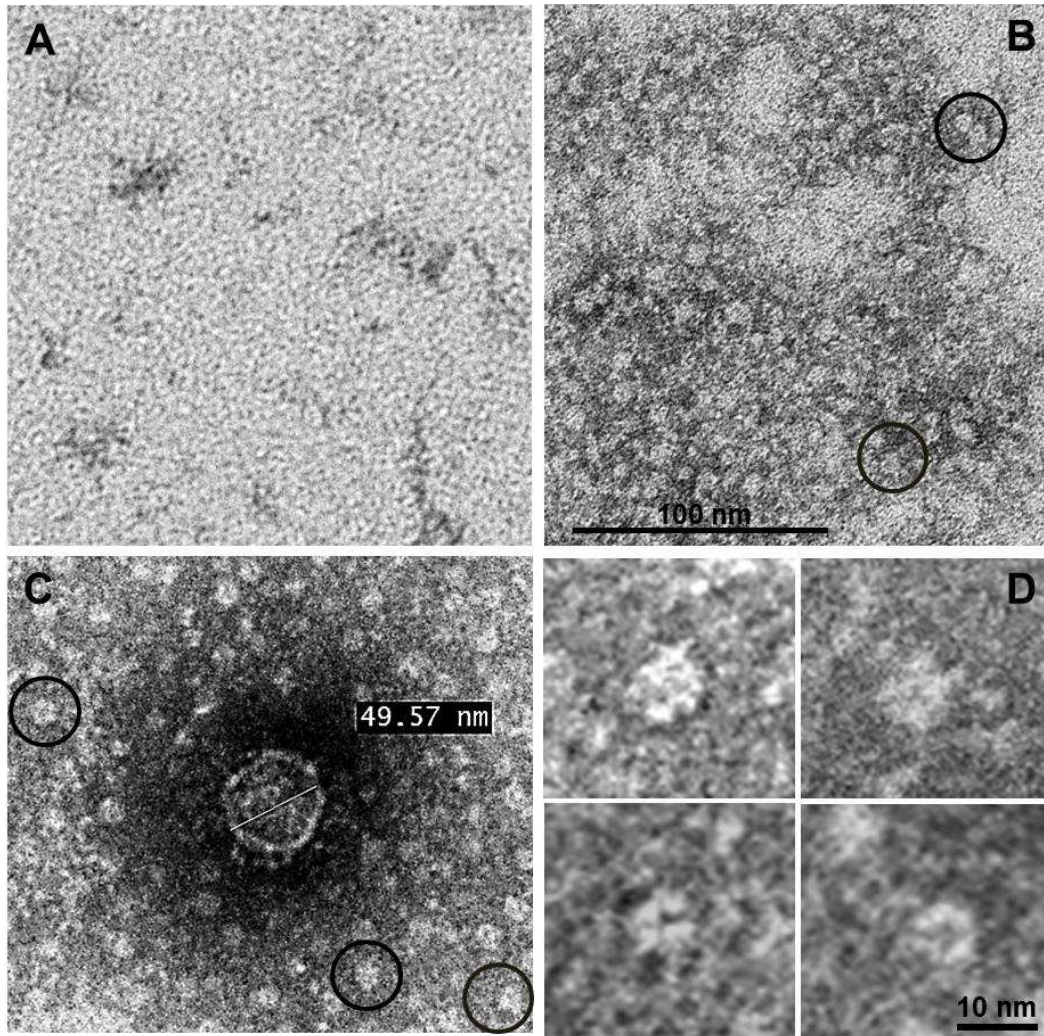


Figura 7. Microscopía Electrónica de la proteína NS1 secretada desde células C6/36HT infectadas con DENV. Sobrenadantes de células no infectadas (A) o infectadas con DENV (B, C, y D) colectadas a 24 hpi , concentradas mediante filtración y teñidas negativamente con acetato de uranilo. La línea en el panel C muestra el diámetro de un virión de DENV incluido como referencia de tamaño. Los círculos negros en el panel C encierran presuntos hexámeros de NS1.

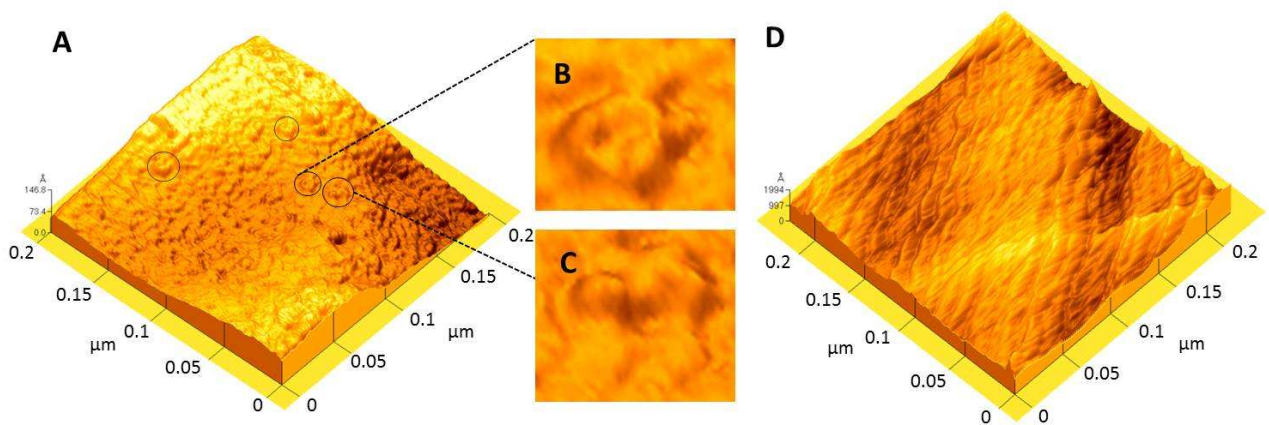


Figura 8. Visualización de la proteína NS1 secretada desde células C6/36HT infectadas con DENV4 mediante Microscopía de Fuerza Atómica. Panel A, perfil de altura de los sobrenadantes de células infectadas. Los círculos negros encierran presuntos hexámeros. Paneles B y C, magnificación de estructuras del panel A mostrando vistas en ejes de simetría 3 y 2 respectivamente. Panel D, perfil de altura de sobrenadantes de células no infectadas.

Estudio de las rutas de secreción de NS1 en células de invertebrados C6/36.

Una vez establecido que las células de insecto si secretan a la proteína NS1, los próximos experimentos estuvieron enfocados en determinar su ruta de secreción.

Existe evidencia en cuanto a la ruta de secreción de viriones en células infectadas con DENV tanto de células de vertebrados como de insectos; sin embargo la ruta de secreción de la NS1 no se conoce a cabalidad. Para estudiar la(s) ruta(s) de secreción de la proteína NS1 en células C6/36HT realizamos dos aproximaciones. En primer lugar mediante el tratamiento de monocapas de células C6/36 infectadas con DENV4 o DENV2 con drogas conocidas que afectan diferentes rutas intracelulares de secreción y en segundo lugar silenciando proteínas claves que se sabe participan en dos vías diferentes de secreción de proteínas.

El tratamiento con brefeldina A no afecta la secreción de NS1 en células C6/36HT

La Brefeldina A (BFA) es una lactona macrocíclica fúngica, la cual es ampliamente utilizada como un inhibidor del tráfico de proteínas en el sistema de endomembranas de mamíferos (Nebenfuhr y col., 2002). La BFA inhibe el tráfico desde el retículo endoplasmático y causa el desensamblaje del aparato de Golgi, ambos organelos implicados en la ruta clásica de secreción de proteínas (Sreenivasan y col., 1993). Si el tratamiento con BFA sobre células infectadas es capaz de inhibir la secreción de NS1, ello será un indicio de que esta proteína está siendo secretada por la vía clásica. Para evidenciar el efecto de la BFA sobre la secreción de NS1, se infectaron monocapas celulares de células C6/36HT, Aag2 y Vero con DENV4 o DENV2 a una MOI=3. A 6 hpi se adicionó la BFA a concentraciones de 7 ug/ml en células C6/36HT y Aag2 y de 0,1 ug/ml en células Vero. Posterior a 24 hpi se recolectaron los sobrenadantes y se determinó la presencia de NS1 soluble mediante el estuche comercial PLATELIA.

Cuando se compararon los niveles de NS1 presente en los sobrenadantes de células C6/36HT infectadas, tratadas o no con BFA, no se observaron diferencias significativas (Fig. 9). Sin embargo, si se observó una reducción del 35% en los niveles de NS1 desde sobrenadantes de células Vero infectadas tratadas con BFA en comparación con las no tratadas (Fig. 9). Para corroborar que las concentraciones de BFA utilizadas eran efectivas, se midieron los títulos virales en los sobrenadantes de células tratadas. Se conoce que la secreción de viriones ocurre a través de la ruta clásica. Los resultados

muestran una reducción de 1 log en las todas las células tratadas con BFA en relación a las no tratadas, lo que indica que la acción de la droga sí fue efectiva, al disminuir la secreción de viriones (Fig. 10). Para corroborar que el efecto de la droga no es serotipo específico, se repitieron los experimentos en ambas líneas celulares infectadas con DENV2. En ambas líneas celulares se reprodujeron los resultados obtenidos en las infecciones con DENV4 (Fig. 11). Adicionalmente, se llevaron a cabo los experimentos en otra línea celular de insectos Aag2, para constatar si los resultados obtenidos desde las células C6/36HT eran reproducibles en más de una línea celular de insecto. Como se esperaba, el efecto de la BFA sobre los niveles de NS1 en sobrenadantes de células Aag2, es similar al ejercido sobre las C6/36HT, donde tampoco se aprecia una disminución de los niveles de NS1 en sobrenadantes (Fig.12). En conjunto, estos datos sugirien que la proteína NS1 se está secretando por una vía insensible a BFA desde células de insecto y por una vía clásica desde células Vero.

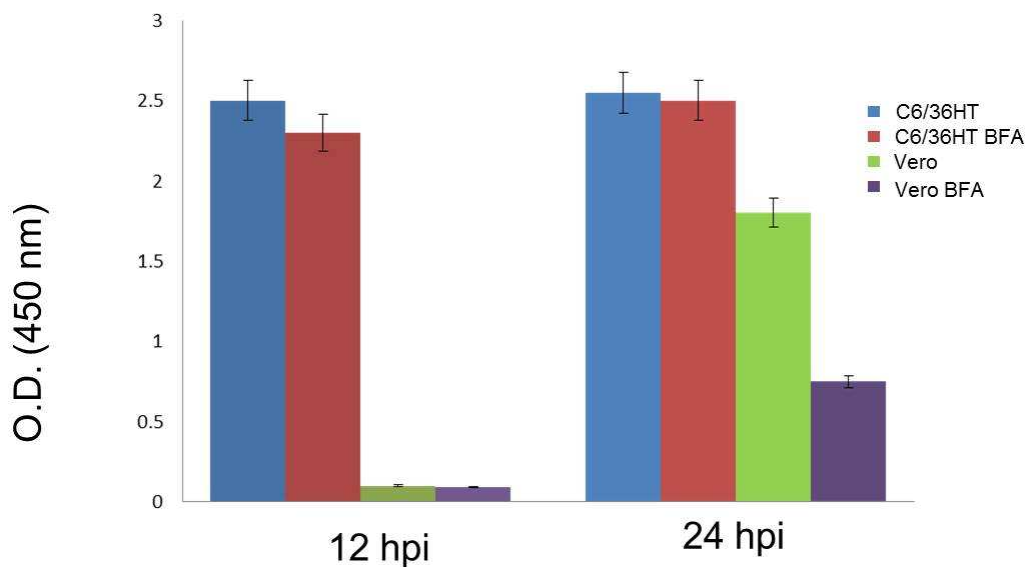


Figura 9. Niveles de NS1 en células C6/36HT y Vero infectadas con DENV4 tratadas o no con Brefeldina A. Los niveles de NS1 presentes en los sobrenadantes células C6/36HT y Vero infectadas con DENV4 y colectados a las 12 y 24 hpi se determinaron utilizando un ELISA comercial. Los datos estan expresados como el promedio \pm desviación estandar. n=5.

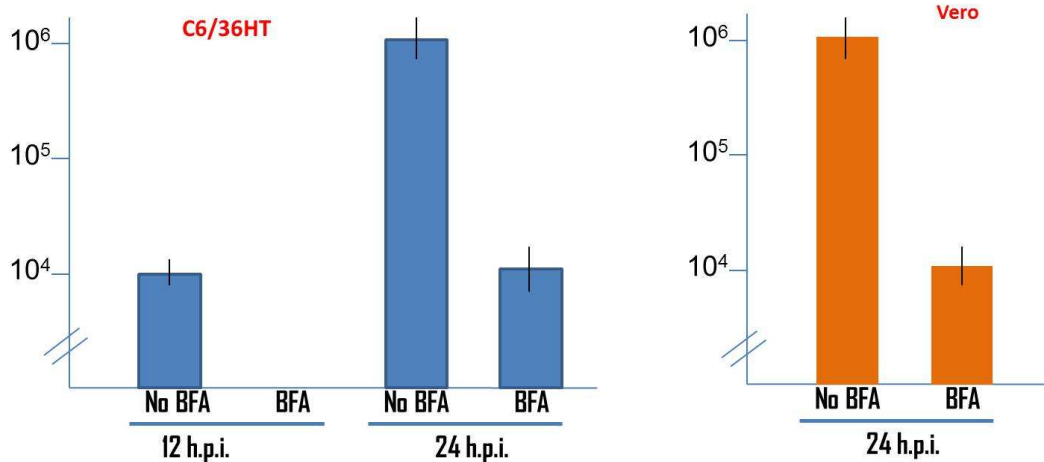


Figura 10. Título viral (pfu/ml) obtenido en sobrenadantes de células C6/36HT y Vero tratadas con y sin Brefeldina A. Células C6/36HT y Vero se infectaron con DENV 4 (MOI=3) y se trataron o no con BFA. Los sobrenadantes se colectaron a las 12 y 24 hpi y se determinó el título viral mediante ensayos de placa en células BHK-21. Los datos extan expresados como el promedio \pm desviación estandar.n=3.

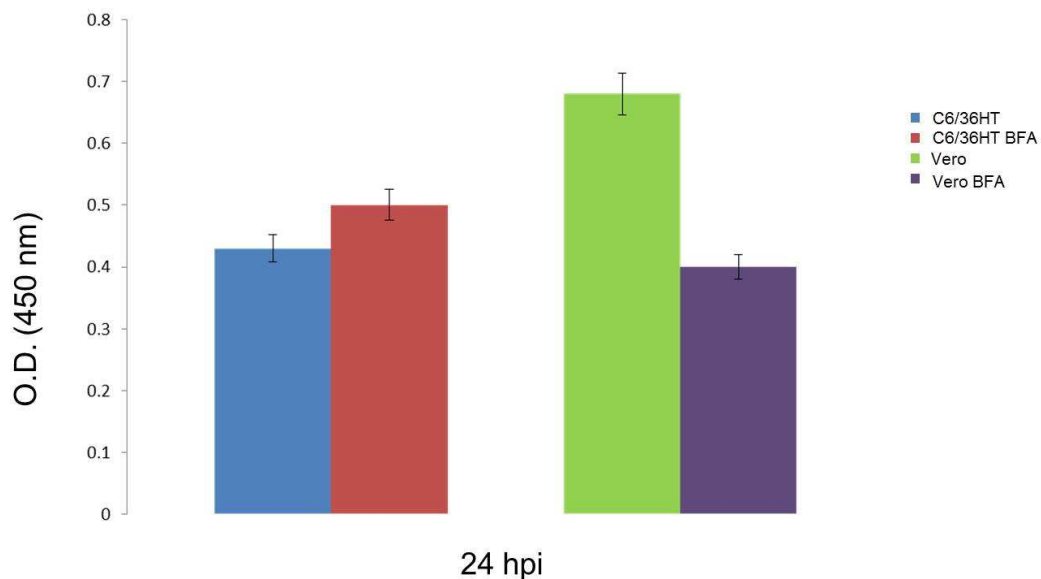


Figura 11. Niveles de NS1 en células C6/36HT y Vero infectadas con DENV2 tratadas o no con Brefeldina A. Los niveles de NS1 presentes en los sobrenadantes células C6/36HT y Vero infectadas con DENV4 y colectados a las 24 hpi se determinaron utilizando un ELISA comercial. Los datos extan expresados como el promedio \pm desviación estandar. n=3

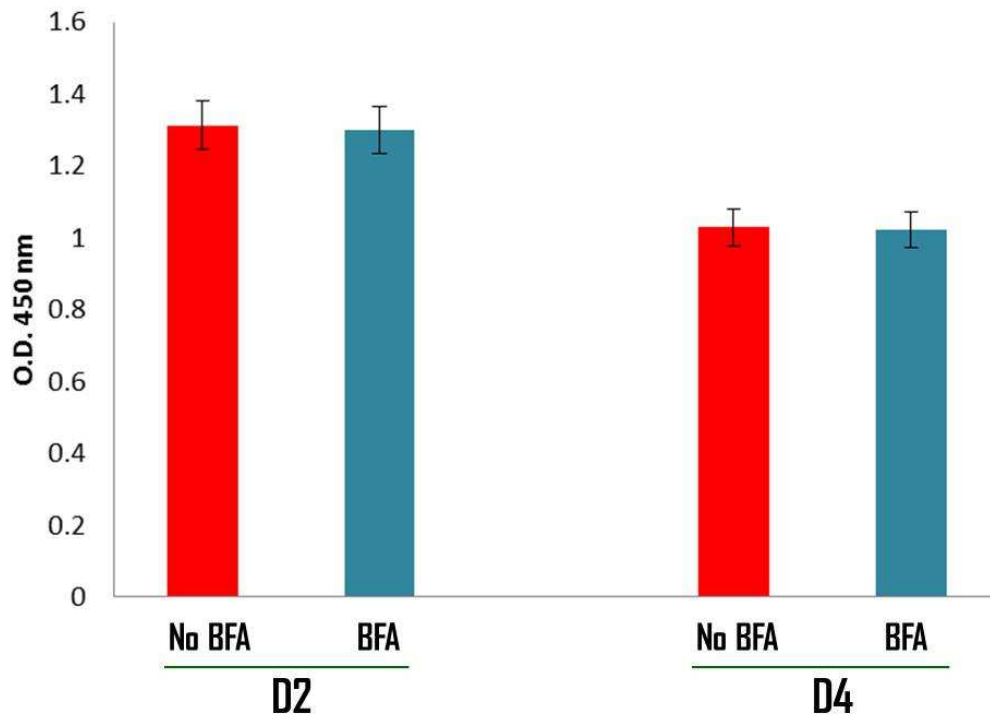


Figura 12. Niveles de NS1 en células Agg2 infectadas con DENV2 o DENV4 tratadas o no con Brefeldina A. Los niveles de NS1 presentes en los sobrenadantes células infectadas recolectados a las 24 hpi se determinaron utilizando un ELISA comercial. Los datos extan expresados como el promedio \pm desviación estandar. n=3

Efecto del silenciamiento de la proteína SAR-1 sobre la secreción de la proteína NS1

Con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos en los experimentos con la BFA, escogimos silenciar la proteína SAR1, la cual es una proteína que participa activamente en la vía clásica de secreción de proteínas ya que es una GTPasa que coordina el ensamblaje de las proteínas que forman el complejo COPII, responsable del transporte de proteínas desde el RER hacia el complejo de Golgi (Cutrona y col., 2013). Se transfectaron células C6/36HT con una mezcla comercial (Qiagen) de 3 silenciadores específicos para la proteína SAR1. El silenciamiento de la proteína se evaluó mediante microscopía confocal y se eligió el tiempo 24 hpt, cuando se evidenció mas de un 85%

de disminución de la marca específica de la proteína SAR1, para hacer las infecciones con DENV4 utilizando una MOI=3. Se hicieron mediciones de los niveles de NS1 en sobrenadantes de células transfectadas tanto con silenciadores irrelevantes como con los específicos para la proteína SAR1 e infectadas. Los resultados indican que en condiciones de silenciamiento de la proteína SAR1 (Fig. 13 A y B), los niveles de NS1 medidos a 12 hpi. en sobrenadantes de células infectadas no varían al ser comparados con los niveles medidos de las células transfectadas con los siRNA irrelevantes (Fig. 13C). Sin embargo, sí evidenciamos una reducción del título viral de 1 log en condiciones de silenciamiento de SAR1 (Fig. 13D), lo que corroboró la efectividad del silenciamiento sobre la inhibición de la secreción de proteínas por la vía clásica. Estos hallazgos, junto con los obtenidos en los experimentos con la BFA, confirman la idea de que la secreción de la NS1 se está llevando a cabo por una vía alterna en células C6/36HT, a diferencia de las células de vertebrados.

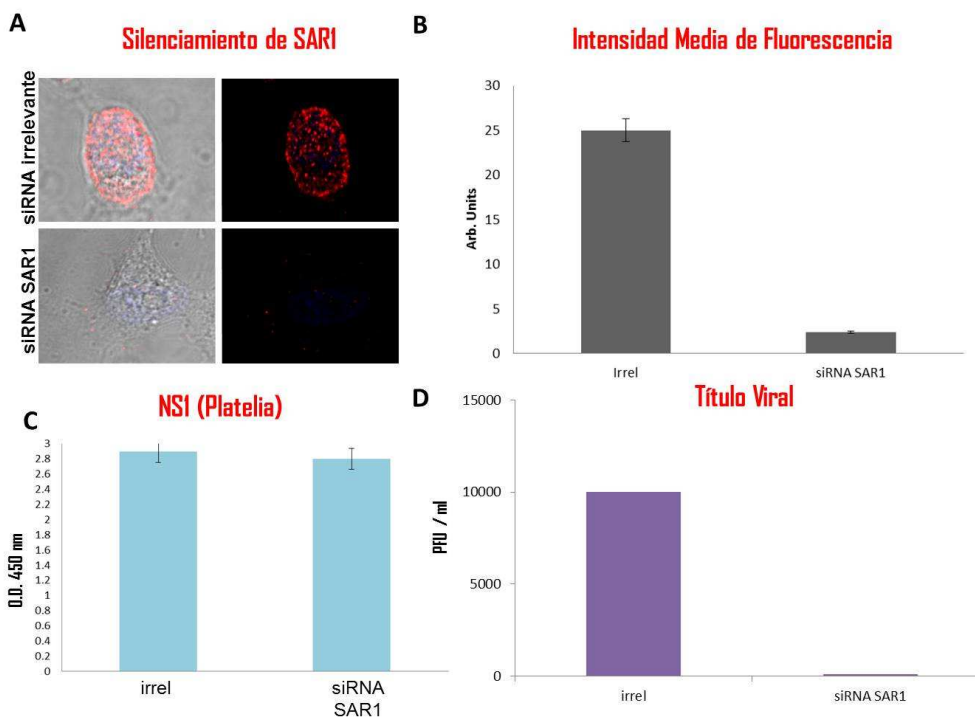


Figura 13. Secreción de NS1 en células C6/36HT silenciadas para SAR1. Se transfectaron células C6/36HT con siRNAs específicos para la proteína SAR1 o con siRNAs irrelevantes, como controles. A 24 hpt se infectaron con DENV4 a MOI=3 y 12 hpi se colectaron los sobrenadantes y se fijaron las células para inmunomarcajes. (A) Microscopía confocal de células C6/36HT marcadas con anticuerpo monoclonal anti-SAR1 y anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a Alexa 488 y núcleos teñidos con DAPI. (B) Intensidades medias de fluorescencia de la marca específica de la proteína SAR1 en células transfectadas con siRNAs específicos o irrelevante. Niveles de NS1 (C) y título viral (D) en sobrenadantes de células infectadas transfectadas con siRNAs específicos o irrelevante. Los datos están expresados como el promedio \pm desviación estandar. n=3

Evaluación de rutas alternas de secreción de la NS1

Teniendo como base los datos anteriores, nos planteamos indagar que ruta alterna pudiera estar siguiendo la NS1 para ser secretada. En este sentido, Gutsche y col. (2011) observaron que al tratar células HEK293 infectadas con DENV con drogas que inhiben la secreción de colesterol o que lo secuestran intracelularmente; como niacina o β metil-ciclodextrina (BMCD) respectivamente, se observaba una reducción significativa de los niveles de NS1 en los sobrenadantes en comparación con las células no tratadas con las drogas. En este trabajo, se reprodujeron estos experimentos, utilizando nuestro modelo de células C6/36HT y la droga BMCD a concentraciones de 3, 6 y 9 μ M, la cual fue adicionada a 6 hpi. Las concentraciones de la BMCD empleadas se establecieron luego de evaluar que no tenían efecto sobre la viabilidad celular (Fig. 14B). Se realizaron las mediciones de NS1 en el sobrenadante 24 hpi, observándose una reducción del 34% en las células tratadas con 3 μ M de la BMCD y del 45% en las células tratadas con 6 y 9 μ M, en comparación con las células no tratadas (Fig. 14A). El título viral no varió y permaneció en 1×10^4 en todas las condiciones (Fig. 14C). Estos resultados son evidencia de que al afectar la vía del colesterol intracelular, también se afecta la secreción de la NS1 en células C6/36HT, pero no la secreción de viriones.

El colesterol sintetizado *de novo* es transportado desde el RE hacia la membrana plasmática, sin pasar por el Golgi, a través de una vía rápida, insensible a BFA (Urbani y col., 1990; Kaplan y col., 1985) llamada el complejo chaperón de caveolina (CCC). Este complejo intracelular soluble integrado por la proteína de choque térmico 56 (hsp56), CAV1, ciclofilina A (CyPA) y ciclofilina 40 (CyP40) traslada al colesterol sintetizado *de novo* a la caveola de la membrana plasmática. La evidencia de que la NS1 colocaliza con proteínas de las balsas lipídicas de membrana (Noisakran, 2008) y su composición lipoproteica, además de los datos obtenidos con BMCD, nos llevan a la presunción de que NS1 pudiera estar siguiendo rutas metabólicas de lípidos para su secreción. Ello convirtió a las proteínas implicadas en esta ruta en blancos para elucidar si esta vía alterna, es utilizada por la célula para la secreción de NS1.

Para evaluar la participación del CCC, se decidió silenciar a la proteína CAV1, utilizando una mezcla de silenciadores comerciales para transfectar las células C6/36HT. A 12 hpt se infectaron células C6/36HT y 12 hpi se recolectaron los sobrenadantes para medir

niveles de NS1 y determinar el título viral. El grado de silenciamiento se midió en la monocapa a ese mismo tiempo. El silenciamiento de la CAV1, se evidenció mediante western blot (Fig. 15) y microscopia confocal (Fig.16 A). En los sobrenadantes colectados se evidenció una reducción del 85% de los niveles de NS1 en condiciones de silenciamiento de la CAV1 en comparación con los niveles en los sobrenadantes en condiciones de silenciamiento irrelevante (Fig. 16C). El título viral en todas las condiciones permaneció en 1×10^4 PFU/ml, indicando que el silenciamiento de la CAV1 no afecta la secreción de partículas virales (Fig. 16D). Estos datos son evidencia de la importancia de la CAV1 y del CCC, en el transporte de la proteína NS1 hacia el medio extracelular y sugieren que NS1 para su secreción en células de insecto, comparte las rutas de movimiento de colesterol.

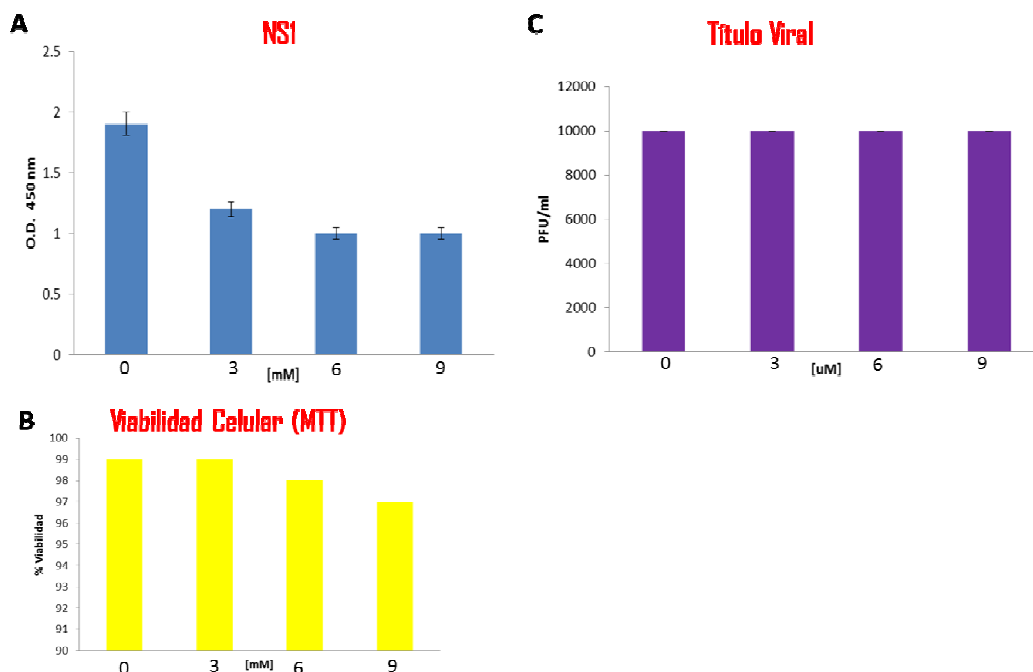


Figura 14. Efecto de la beta metil ciclodextrina sobre la secreción de NS1 en células C6/36HT. Células C6/36HT fueron infectadas con DENV4 (MOI=3) y tratadas con BMCD (3, 6 y 9 mM), se colectaron los sobrenadantes a 24 hpi y se determinaron los niveles de NS1 (A), el título viral (C) y la viabilidad celular (B). Los datos están expresados como el promedio \pm desviación estándar. n=4.

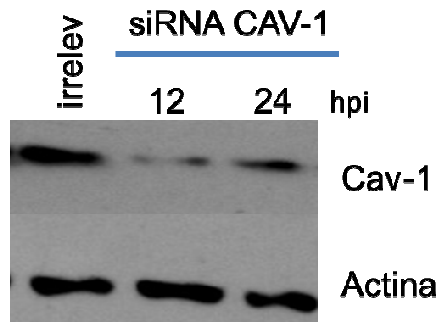


Figura 15. Silenciamiento de CAV1 en células C6/36HT. Se transfectaron células C6/36HT con siRNAs específicos para CAV1 o irrelevantes. A las 12 y 24 hpi se lisaron las monocapas celulares y se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida y western bot para constatar el grado de silenciamiento de CAV1. La proteína actina fue detectada como control de carga. n=2.

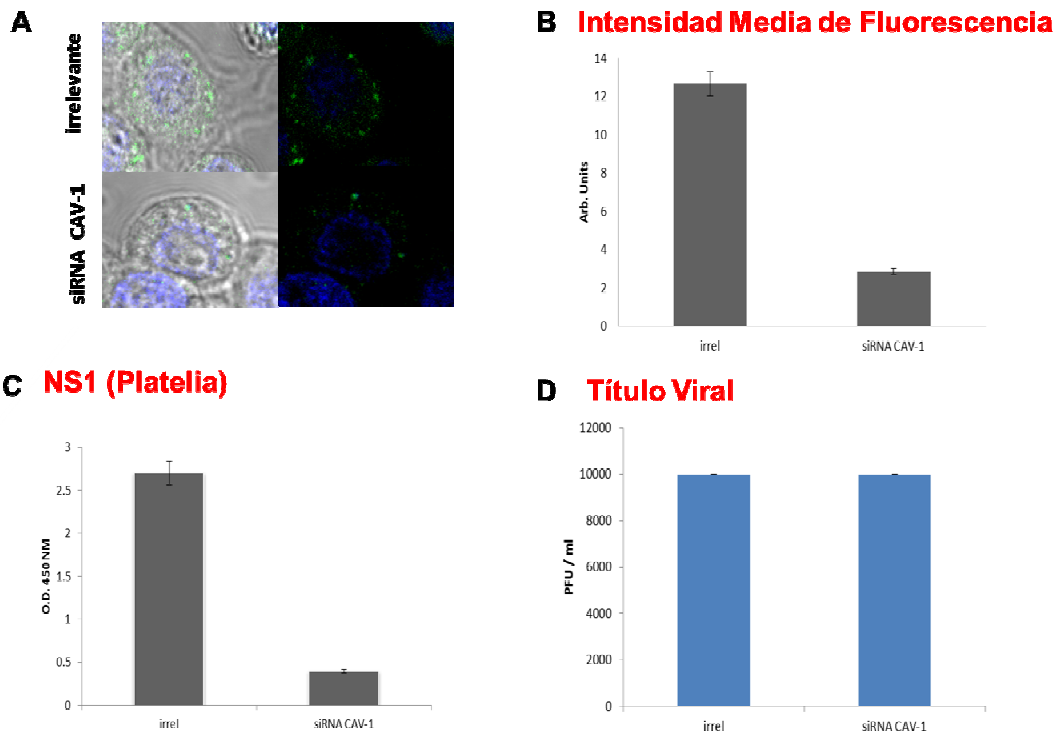


Figura 16. Secreción de NS1 en células C6/36HT silenciadas para CAV1. Se transfectaron células C6/36HT con siRNAs específicos para la proteína CAV1 o con siRNAs irrelevantes, como controles. A las 12 hpt se infectaron con DENV4 a MOI=3 y 12 hpi se colectaron los sobrenadantes y se fijaron las células para inmunomarcajes. (A) Microscopía confocal de células C6/36HT marcadas con anticuerpo monoclonal anti-CAV1 y anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 565 y núcleos teñidos con DAPI. (B) Intensidades medias de fluorescencia de la marca específica de la proteína CAV1 en células transfectadas con siRNAs específicos o irrelevante. Niveles de NS1 (C) y título viral (D) en sobrenadantes de células infectadas transfectadas con siRNAs específicos o irrelevante. Los datos están expresados como el promedio \pm desviación estándar. n=3

Interacción de las proteínas CAV1 y NS1

Con base en los resultados anteriores, nos planteamos evaluar de qué forma está participando la CAV1 en el proceso de secreción de la proteína NS1. Para ello, comenzamos por realizar análisis *in silico* para determinar si la secuencia de la NS1 de los 4 serotipos del virus dengue poseían alguno de los 4 dominios de unión a CAV1 (CBD) descritos previamente en proteínas que interaccionan con ella (Byrne y col., 2012).

Al analizar las secuencias de aminoácidos de la proteína NS1, se identificó uno de los dominios de unión a CAV1 (**YXFXFXFXW**, donde X es cualquier aminoácido) presente de manera conservada entre las posiciones a.a. 158-168, de los 4 serotipos de DENV (Fig. 17, panel A). Este motivo no fue identificado al analizar la secuencia de aminoácidos de las otras proteínas no estructurales del DENV (NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B o NS5) ni en la secuencia de la NS1 de otros flavivirus cercanos filogenéticamente como lo son el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la encefalitis de San Luis, el virus de la encefalitis del valle de Murray o el virus de la encefalitis Tick Borne (Figs. 17, panel B). Debido a que los motivos de interacción a CAV1 son relativamente ubicuos y no ser funcionales al encontrarse no expuestos sobre la proteína (Byrne y col., 2012), utilizando el programa Cn3D se ubicó la posición del dominio putativo CBD en NS1 y se encontró que este se encuentra expuesto sobre la cara hidrofóbica del dímero formando un asa que conecta las láminas $\beta 8$ y $\beta 9$ (Fig. 18). El grado de conservación del CBD en la secuencia de la NS1 de los 4 serotipos de DENV así como su posición expuesta sobre la cara hidrofóbica de la proteína, sugiere que dicho dominio pudiera ser funcional para establecer interacciones directas entre NS1 y CAV1.

Para evaluar la posible interacción entre la proteína CAV1 y NS1 se realizaron modelados y cálculos teóricos mediante análisis *in silico* utilizando métodos de mecánica clásica. Con base en los resultados de las energías de interacción generadas luego del modelado molecular de los diferentes segmentos de las proteínas analizadas (Fig. 19) se evidencian valores negativos correspondientes a la interacción de la proteína NS1 con el SD de la CAV1, seguido del CBD de la NS1 con el SD de la CAV1. Por otra parte, la energía de interacción entre la proteína NS3c y el SD de la CAV1 arrojan valores positivos (Tabla 4). Los valores de interacción negativos reflejan una mayor probabilidad de interacción entre las dos proteínas modeladas siendo estas más favorables termodinámicamente, no así en el caso de los valores positivos, lo cual implica que se requeriría un alto costo energético para que ocurra la reacción, como el caso de los obtenidos entre la proteína NS3c y el SD de CAV1 modelados como controles negativos de interacción (Tabla 4). Es decir, que los estudios realizados *in silico* utilizando metodología de mecánica cuántica, sugieren fuertemente interacciones a nivel molecular entre NS1 y CAV1 a través del CBD de NS1 y el SD de la CAV1.

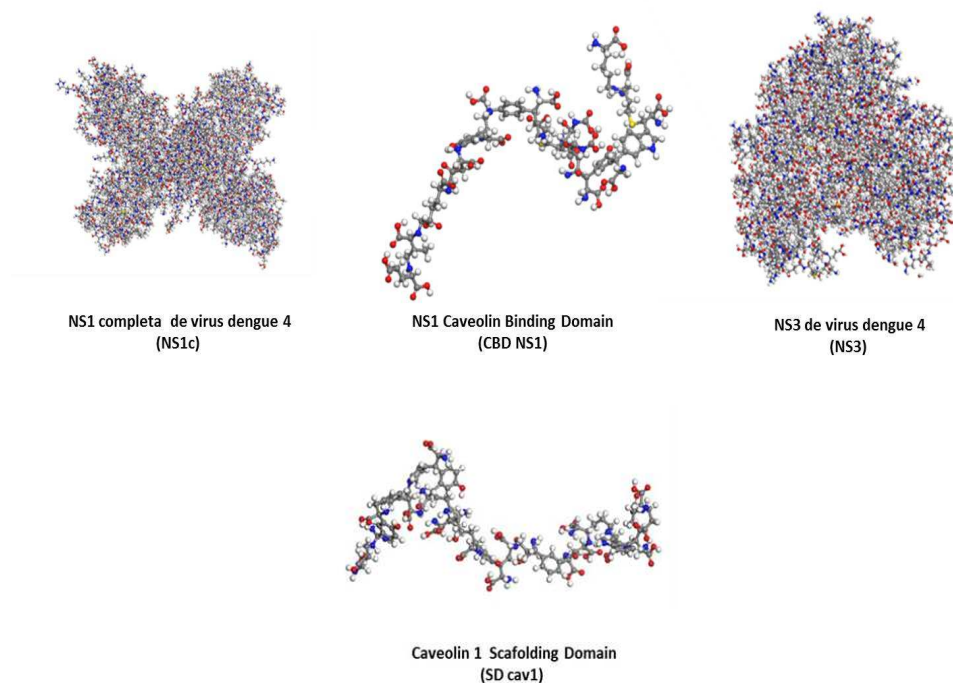


Figura 19. Modelo de las diferentes moléculas analizadas para los cálculos de interacción. Los modelos para NS1 y NS3 fueron tomados directamente del banco de datos. Los modelos para el dominio de unión a CAV1 de NS1 y del “scaffolding domain” de CAV1 fueron modelados con Study Material.

Tabla 4. Valores de las energías de interacción mediante mecánica clásica.

Modelos	Energía de interacción (eV)
NS3 completa –SD de CAV1	18.363
NS1c – SD de CAV1	-27.319
CBD de NS1 – SD de CAV1	-6.479

NS3c: proteína NS3 DENV, SD CAV1: Scaffolding Domain de la proteína CAV1, NS1c: secuencia completa de la proteína NS1, CBD NS1: secuencia del CAV1 binding domain en la NS1.

Los valores obtenidos del análisis de interacción mediante la metodología descrita por Belmares y col (2004) fueron de -0.347 eV y de -13.521 para la energía de interacción de la mezcla y el parámetro de Flory-Huggins, respectivamente. La negatividad de ambos valores indica que existe una miscibilidad completa en la mezcla de la proteína NS1c con CAV1, cuando son analizadas en base a su comportamiento como soluto o solvente. Estos resultados están en concordancia y refuerzan los resultados obtenidos por mecánica clásica. En conjunto, los cálculos de las metodologías teóricas aplicadas establecen que existe una predicción teórica favorable de interacción entre la proteína NS1 y el SD de CAV1.

Colocalización de NS1 y CAV1 en células C6/36

Una vez establecido mediante análisis *in silico* que existen altas probabilidades de que las proteínas CAV1 y NS1 interactúen directamente, se buscó evidencia de si estas interacciones están ocurriendo en células C6/36HT infectadas. Para ello, se realizaron ensayos de colocalización de ambas proteínas en células C6/36HT infectadas con DENV4 y fijadas a 6, 12 y 24 hpi, utilizando microscopía confocal. Los resultados sugieren que existe una interacción dinámica entre NS1 y CAV1 a lo largo de la infección (Fig. 20). A las 6 hpi se observó un coeficiente de colocación entre las proteínas NS1 y CAV1 de 60, el cual disminuyó a 8 y 11, para las 12 y 24 hpi, respectivamente. Estos resultados sugieren que la proteína NS1 y CAV1 interactúan en células C6/36HT infectadas con DENV, en concordancia con los resultados obtenidos *in silico*.

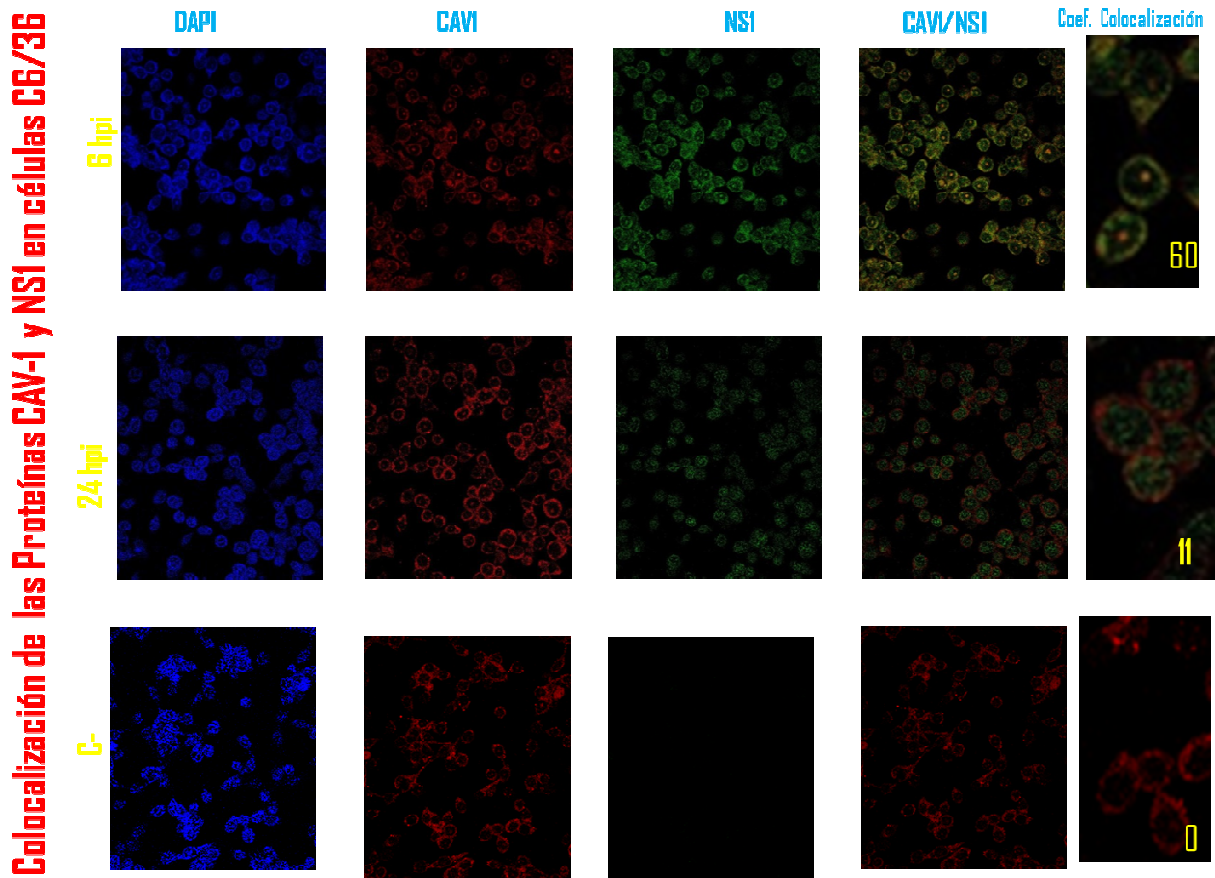


Figura 20. Microscopía confocal para evaluar la colocalización entre las proteínas CAV1 y NS1 en células C6/36HT. Células C6/36HT fueron infectadas con DENV4 (MOI=3) y fijadas a las 6 y 24 hpi y se marcaron con anticuerpos específicos para las proteínas CAV1 y NS1, los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. En números amarillos se indica el coeficiente de colocalización correspondiente a cada condición. Como controles negativos (C-) se marcaron células sin infectar con ambos anticuerpos.

DISCUSION

Recientemente varios autores han reportado la secreción de NS1 en células de insecto (Keelapang y col. 2004, Ludert y col. 2008, Ramírez y col. 2010), en claro contraste con lo previamente reportado por otros (Mason 1989, Flammand y col. 1999). Sin embargo, existe la posibilidad de que la presencia de NS1 en sobrenadantes de células de insecto infectadas se deba a lisis celular (Muller y Young, 2013). Para tratar de resolver esta contradicción, se infectaron monocapas de las células de insecto C6/36HT y Aag2 y como control a monocapas de células Vero con DENV4 y DENV2 y a diferentes tiempos post infección se realizaron mediciones de los niveles de NS1 en los sobrenadantes y se determinó la viabilidad utilizando 5 metodologías diferentes. A 24 hpi, los porcentajes de viabilidad en las 3 líneas celulares variaron entre un 94 y un 99% (Tabla 2) y a tiempos tempranos (3 hpi) entre 97 y 99% en células C6/36HT (Tabla 3). El incremento paulatino de los niveles de la proteína NS1 en sobrenadantes durante el curso de la infección sin que se observe una disminución en los porcentajes altos de viabilidad desde tiempos tempranos en células C6/36HT, indica que la presencia de NS1 en sobrenadantes de cultivos no se debe a procesos de lisis celular.

La presencia de la proteína NS1 fue detectable en sobrenadantes de ambas líneas células de insecto (C6/36HT y Aag2) a partir de 6 hpi, con un incremento paulatino en el transcurso de la infección. Sin embargo, se presentaron variaciones en el comportamiento de los serotipos de DENV utilizados. La producción de NS1 soluble en pacientes o en modelos animales es dependiente de la cepa viral y del huésped (Alcon-LePonder y col., 2006; Watanabe y col., 2012). Las variaciones observadas entre los niveles de NS1 liberada desde células C6/36HT y Aag2 infectadas con DENV serotipos 2 y 4 sugieren que este comportamiento también se repite en células de insecto. Por otra parte, en las células Vero, la proteína NS1 fue detectable solo después de las 12 hpi. Esta cinética puede parecer extraña, sin embargo ya ha sido observada previamente en células Vero infectadas con DENV (Ludert y col., 2008) y en células hepáticas humanas infectadas con DENV2 (Watanabe y col., 2012) y posiblemente solo se deba a diferencias en la velocidad de replicación del virus en un tipo de células u otro. Sin embargo, las diferencias en la cinética de secreción entre células de insecto y

vertebrados también pudiera ser reflejo de distintas rutas de tráfico para NS1 entre ambos tipos celulares.

Previamente, en un trabajo pionero en el área, Mason (1986) había reportado diferencias en la presencia de NS1 en sobrenadantes de células de mamíferos (Vero) y mosquitos (C6/36, AP61, TRA284) infectadas con el virus de la encefalitis japonesa (JEV), observando que tanto la proteína E como la NS1 fueron liberadas al sobrenadante de células Vero, mientras que solo la proteína E fue liberada en sobrenadante desde células de insecto. Los autores evidenciaron que la proteína NS1 se produjo de forma abundante en células de insecto pero permaneció en el espacio intracelular. El hecho de que existen diferencias entre las vías de síntesis de glicoproteínas entre células de vertebrados e invertebrados y la incapacidad de las células de insecto de generar oligosacáridos complejos se esgrimió como la razón de la retención de la NS1 de JEV dentro de las células. No obstante, es importante hacer notar que aunque la proteína NS1 está relativamente bien conservada dentro de los flavivirus (Muller y Young, 2013; Akey y col. 2014), existen diferencias entre las secuencias aminoacídicas entre la NS1 de JEV y la de DENV, que pueden explicar la discrepancia de resultados entre el trabajo de Mason (1986) y éste.

Youn y col. (2010) en un estudio enfocado en determinar las bases genéticas que pudieran direccionar la distribución intracelular de la proteína NS1 en los flavivirus, desarrollaron una serie de quimeras entre WNV y DENV, encontrando que la posición 10 aminoacídica es crítica para el direccionamiento hacia la membrana plasmática y secreción de la NS1 en ambos flavivirus. Específicamente, cuando mutaron el aminoácido en esta posición (Asn por Asp), observaron una disminución en la expresión de la NS1 de WNV en la superficie de la membrana plasmática de células BHK21 y un incremento en su secreción. Interesantemente, la introducción en esa misma posición de los aminoácidos Asn y Lys presentes en la secuencia de DENV en sustitución de las aminoácidos Arg y Glu de la secuencia de WNV, resultó en la secreción de la proteína NS1 de WNV a sobrenadantes de células C6/36. Tanto el JEV como WNV y otros flavivirus, presentan el aminoácido Arg en la posición 10, mientras que DENV presenta Asp o Gly en esta posición, dependiendo del serotipo (Youn y col., 2010). Los estudios de Youn et al. (2010) indican que la diferencia entre los resultados de Mason (1989) y este trabajo se debe a diferencias en la secuencia primaria de

aminoácidos entre las proteínas NS1 de ambos virus, ya que DENV difiere de otros flavivirus, incluyendo WNV, precisamente en la posición 10. Sería interesante evaluar si la sustitución del aminoácido en la posición 10 de JEV por el de DENV resulta en la secreción de la NS1 de JEV desde células de insecto, como se observó en WNV, o si por el contrario, sustitución de la Asp o Gly de la posición 10 de DENV por Arg, resulta en la retención de la NS1 de DENV en células de insecto.

La proteína NS1 se ubica intracelularmente en células de vertebrados y adicionalmente se ha descrito que es capaz de asociarse por la cara externa de la membrana plasmática como resultado de su transporte desde el espacio intracelular por rutas aun no conocidas o como resultado de la unión (“binding back”) de la forma soluble previamente secretada (Avirutnan y col., 2007; Muller y Young, 2013). En este trabajo evaluamos si la proteína NS1 era también traficada hacia la membrana plasmática o era capaz de unirse a la superficie de la membrana plasmática de células C6/36 infectadas con DENV4, utilizando microscopía confocal, citometometría de flujo y inmunomicroscopía electrónica. Sin embargo, por ninguna de las 3 técnicas se obtuvo evidencia que indicara la presencia de NS1 sobre la cara externa de la membrana plasmática de células de insecto infectadas. Debido a que se utilizó un suero hiperinmune para la detección de la proteína y a que los epítopes antigénicos de NS1 están bien expuestos (Edeling y col., 2014), es poco probable que la pérdida de reconocimiento se deba a diferencias en la conformación de epítopes o a la accesibilidad a estos. Nuestros resultados coinciden con estudios previos enfocados en estudiar la distribución de NS1 en células de mosquito infectadas, en donde observó que ésta solo se localizaba en la región perinuclear, con un patrón de distribución similar a la proteína C, pero no sobre la membrana plasmática (Junjhon y col. 2014). Además, Youn y col. (2010) evidenciaron que existe una correlación inversa entre la aparición de la NS1 en la superficie de la membrana plasmática y su secreción al medio en células de vertebrados, hallazgo que guarda relación entre los altos niveles de NS1 que se secretan desde células de insecto y la poca o ninguna expresión de la proteína en la superficie de la membrana plasmática.

La unión de la proteína NS1 a la membrana plasmática esta mediada por motivos de GPI adquiridas durante el tránsito de la proteína a través del aparato de Golgi (Noisakran y col., 2008) por lo que la ausencia de la NS1 sobre la membrana plasmática

de células de mosquito infectadas y la presumible ausencia de motivos de GPI, sugiere que existen diferencias entre la ruta de tránsito de la NS1 desde células de mosquito y de vertebrados. Adicionalmente, se ha reportado que la unión de la NS1 a células de vertebrados puede estar mediada por glicosaminoglicanos y mostrar especificidad por ciertos tipos celulares (Avirutnan y col., 2007). Debido a que el origen de la línea celular C6/36, se desconoce, sería interesante evaluar la capacidad de la NS1 de unirse a otras líneas celulares de insecto, incluyendo Aag2.

Aunque en la secuencia de la NS1 no están presentes señales de localización nuclear, los ensayos de inmuno-microscopía electrónica evidenciaron la presencia de la NS1 en el núcleo y nucléolo de células infectadas, incluso a 6 hpi. La presencia de NS1 en el núcleo también se hace evidente en el trabajo de Junjhon y col. (2014) estudiando células de mosquito infectadas con DENV. La presencia de la proteína NS1 de DENV también ha sido descrita en el núcleo de células BHK-21 y de células endoteliales (Poungsawai et al., 2011, Akey y col., 2014), pero la importancia, si alguna, de la presencia de NS1 en el núcleo de células infectadas se desconoce. Recientemente, se reportó que la NS1 interacciona con la ribonucleoproteína L18 (RPL18) en células de vertebrados y esta interacción demostró ser de importancia probablemente para el proceso de transcripción/replicación viral (Cervantes-Salazar y col. 2015). La presencia de NS1 en el núcleo pudiera ser necesaria para llevar a cabo uno o varios procesos durante la replicación viral, por lo que es de importancia dilucidar a que obedece la localización nuclear de NS1 tanto en células de vertebrados como de insectos.

El análisis por microscopía electrónica y por AFM de sobrenadantes concentrados desde células C6/36HT infectadas con DENV4, mas no desde sobrenadantes de células no infectadas, reveló la presencia de un material particulado compatible en tamaño y estructura con la forma de barril hueco reportada previamente para la forma hexamérica secretada de la NS1 desde células infectadas de vertebrados o de células de insecto transfectadas con baculovirus recombinantes (Gutsche y col., 2011; Muller y col., 2012; Akey y col., 2014). Estos resultados en conjunto con los resultados de entrecruzamiento y western blot, sugieren que la NS1 es secretada desde células de insecto como un hexámero en forma de barril. En concordancia con lo anterior, en observaciones previas mostraron que la proteína NS1 soluble presente en sobrenadantes de células de insecto y de vertebrados infectadas, deja de ser

reconocida por el estuche comercial dengue NS1 PLATELIA™ si las muestras son hervidas previamente, sugiriendo la naturaleza oligomérica de la proteína NS1 presente en los sobrenadantes. Entre células de insecto y de vertebrados existen diferencias importantes en el metabolismo de colesterol y otros lípidos, así como también en el procesamiento de glicoproteínas, por lo que es posible que la composición de lípidos difiera significativamente entre hexámeros liberados desde células de insectos y de vertebrados. Igualmente, aunque los residuos de asparagina en la secuencia de la proteína NS1 ubicados en las posiciones 130 y 207 parecen ser reconocidos y glicosilados en células de insecto (Hsiehy Robbins, 1984), se esperarían diferencias en el procesamiento de oligosacáridos y la ausencia de oligosacáridos complejos en el hexámero secretado desde células de insecto.

La proteína NS1 del virus dengue es de vital importancia para la replicación y patogénesis viral, aunque aún falta por conocer en relación a sus funciones y mecanismos de acción. Si se confirma la secreción eficiente de la NS1 evidenciada *in vitro* en este trabajo pero en mosquitos intactos, se abrirían nuevas líneas de investigación orientadas a establecer la participación de la NS1 en el mosquito vector o durante la infección en huéspedes vertebrados.

Una vez establecido que la NS1 es secretada desde células de insecto infectadas con DENV, nos planteamos dilucidar que ruta está siguiendo esta proteína para ser secretada. En general, de la ruta de tráfico de la proteína NS1 desde el RER hasta sus distintos destinos se conoce muy poco. La vía clásica representa la principal ruta de secreción de proteínas en células. Esta ruta involucra el paso del péptido a secretar por el retículo endoplásmico (RE) y el complejo de Golgi. Para evaluar la participación de esta vía, en primer lugar tratamos monocapas de células de insectos (C6/36HT o Aag2) y de vertebrado (Vero) infectadas con DENV4 o DENV2 con la droga BFA, la cual inhibe el tránsito de proteínas a través de la vía clásica de secreción. Se evidenció, que la acción de la BFA a las concentraciones empleadas, no ejerce efecto sobre la secreción de la NS1 en células de insecto. Por el contrario, si se observó una disminución de un 35% de la secreción de NS1 en sobrenadantes de células de vertebrado. Adicionalmente, se observó una disminución del título viral en todas las líneas celulares, independiente del serotipo infectante, cuando se trataron con la BFA, lo que indica que la droga si tuvo efecto disturbando la secreción de viriones por la vía

clásica. Estos hallazgos, sugieren que la NS1 es secretada por una vía alterna insensible a BFA desde células de insecto; además, debido a que solo hubo una disminución parcial de la secreción de NS1 desde células Vero, cabe la posibilidad de que en células de vertebrados, NS1 utilice para su salida más de una ruta.

Para corroborar los resultados obtenidos en los experimentos con la droga BFA y determinar que la ruta clásica de secreción de proteínas esta implicada o no en la secreción de la NS1, se silenció la proteína GTPasa SAR1, la cual dirige el ensamblaje de las proteínas de la cubierta de las vesículas COPII responsables del transporte de proteínas desde el RE hacia el Golgi (Miller y Schekman, 2013). En condiciones de silenciamiento de la proteína SAR1, no se evidenciaron cambios en los niveles de NS1 en sobrenadantes de células C6/36HT infectadas con DENV4, colectados a 24 hpi. Al contrario, si se observó una disminución de 1 log en el título viral en los sobrenadantes de células silenciadas en relación a los sobrenadantes de células transfectadas con el silenciador irrelevante. Estos resultados en conjunto, confirman la idea de que la proteína NS1 está siendo secretada por una vía alterna a la ruta clásica de secreción desde células de insecto. Aunque el sistema RE-Golgi es una maquinaria molecular extremadamente precisa y eficiente para exportar proteínas, también se han descrito otras rutas de secreción de proteínas no convencionales o vías alternas (Nickel y Rabouille, 2009). Un ejemplo de vías alternas, es la que ocurre para secretar el colesterol, el cual es sintetizado *de novo* desde el RE y secretado por una ruta vesicular que no involucra su paso por el complejo de Golgi (Urbani y Simoni, 1990). Este transporte de colesterol esta mediado por la proteína caveolina, la cual se ha descrito es capaz de unirse a moléculas de colesterol y de transportarlas desde el RE hacia la membrana plasmática (Smart y col., 1996).

Se ha evidenciado, que el tratamiento de células de riñón embrionicas humanas (HEK293) infectadas con DENV y tratadas con el compuesto BMCD, el cual es un agente quelante de colesterol, reduce significativamente los niveles de NS1 en sobrenadantes (Gutsche y col., 2011). Contrariamente, el tratamiento con BMCD no afecta los niveles intracelulares de NS1, lo que indica que la droga no afecta su traducción ni otro proceso relacionado con la dinámica de producción de NS1 (Gutsche y col., 2011). En búsqueda de dilucidar cuál es la ruta alterna que está siendo utilizada por las células de insecto para secretar a la NS1, reproducimos los experimentos con la

droga BMCD para evaluar que efecto tenía alterar la dinámica intracelular de colesterol en nuestro modelo. Para ello, se infectaron células C6/36HT con DENV4 a una MOI=3, luego de 6 hpi se trataron las células con 3 concentraciones no tóxicas del compuesto BMCD (0, 3, 6 y 9 mM) y se colectaron los sobrenadantes a 24 hpi. Los niveles de NS1 experimentaron una reducción significativa de un 34 % en las células tratadas con 3 mM y de un 45% en las células tratadas con 6 y 9 mM en relación a las células no tratadas. Estas disminuciones observadas en los niveles de NS1 ante el tratamiento con la BMCD, evidencian que al afectar la dinámica intracelular de colesterol, también se afecta la secreción de la proteína NS1 en células C6/36HT.

Profundizando específicamente en la ruta de transporte del colesterol entre el RE y la membrana plasmática, se ha descrito previamente que el colesterol sintetizado *de novo* en el RE es transportado hacia la membrana plasmática por una vía rápida e insensible a BFA a través de un complejo proteico conformado por las proteínas CAV1, las ciclofilinas A y 40 (CyPA y CyP40) y la proteína de choque térmico 56 (HSP56), denominado Complejo Chaperón de Caveolina (CCC). Debido a que se evidenció que al alterar la dinámica de colesterol intracelular se afectaba la secreción de NS1 y a que la NS1 es una lipoproteína para la cual es indispensable interactuar con los lípidos que forman parte de su estructura tanto para su ensamblaje eficiente como para su egreso (Gutsche y col., 2011), nos propusimos silenciar a la proteína CAV1 por ser una proteína clave del CCC y evaluar su efecto sobre la secreción de NS1.

En condiciones de silenciamiento de la CAV1, se evidenció una reducción de 85% de los niveles de NS1 en los sobrenadantes colectados; sin embargo, el título viral no mostró variación en sobrenadantes de células infectadas en relación a las transfectadas con silenciadores irrelevantes. Esto indica que la proteína CAV1 está involucrada en el proceso de secreción de la NS1, lo que refuerza la idea de que la NS1 pudiera estar siguiendo rutas metabólicas de lípidos para alcanzar el espacio extracelular en células C636/HT (Gutsche y col., 2011). Aunque las células de insecto no sintetizan colesterol *de novo* desde compuestos simples, sí son capaces de tomar ésteres de colesterol del medio para sintetizar otras formas de lípidos, los cuales participan en funciones vitales de la célula y para lo cual necesitan ser transportados entre compartimientos y hacia la membrana plasmática, así como también ser secretado al medio extracelular para mantener sus niveles en balance (Zhang et al 2014). Por otra parte, la ausencia de

cambios en el título viral en células tratadas con BMCD y con el silenciamiento de CAV1, concuerda con resultados previos reportados por Umashankar y col. (2008) quienes observaron que la utilización de células de mosquito depletadas de colesterol no tenía ningún efecto sobre la replicación del DENV.

Una vez establecida la importancia de la proteína CAV1 como parte del CCC en la secreción de la NS1, evaluamos mediante análisis *in silico* a través de diversas metodologías si la interacción entre ambas proteínas pudiera estar ocurriendo. Para esto, se modelaron las estructuras de la NS1 y del CSD de la CAV1 para luego someterlas a análisis de predicción de interacciones. Con base en las energías de interacción negativas generadas de los análisis *in silico* por diversas metodologías, se pudo establecer que existe una alta probabilidad de que la CAV1 y la NS1 interactúen en un sistema fisiológico. Se ha reportado que al menos el 30% de las proteínas celulares reportadas hasta ahora poseen algún dominio de unión a CAV1. Sin embargo, no hay evidencias estadísticas de que estas proteínas estén enriquecidas en el interactoma de CAV1. Ello se debe en parte a que estos dominios aromáticos se encuentran generalmente escondidos dentro de la proteína, lo que hace improbable que puedan darse interacciones con la CAV1 (Byrne y col., 2012). No obstante, en la NS1, el CBD se encuentra ubicado en el dominio β -roll, específicamente en una región prominente denominada “dedos de mantequilla” (butter fingers), los cuales son prolongaciones en forma de asa, la cual se predice son utilizadas por la forma dimérica de la NS1 para anclarse a membranas y poder establecer las interacciones necesarias en ausencia de dominios transmembranales (Akey y col., 2015). Huang y col., (2007), reportan que la proteína de envoltura gp41 del VIH es capaz de interactuar con la CAV1 a través de la membrana plasmática, lo que hace suponer que este tipo de interacción también pudiera darse entre NS1 y CAV1 a través de la membrana del RE, en cuyo lumen se encuentra la forma dimérica de la proteína.

Para obtener evidencia de si ocurren interacciones entre NS1 y CAV1 en células infectadas, se realizaron experimentos de colocalización los cuales sugieren que efectivamente existen interacciones entre ambas proteínas. Interesantemente, esta parece ser dinámica, ya que la intensidad determinada por el coeficiente de colocalización, disminuye a medida que avanza la infección. Para determinar, si esta dinámica obedece a algún patrón y/o pueda estar asociada a determinados eventos

como mayor presencia de NS1 en sobrenadantes cuando hay menor colocalización intracelular o viceversa, se tendría que evaluar tiempos intermedios y posteriores de infección a los evaluados, así como también corroborar con otras metodologías que permitan correlacionar los niveles de NS1 dentro y fuera de la célula.

La CAV1 es una proteína a la que se le han atribuido una variedad de funciones, entre ellas, desencadenar cascadas de traducción de señales a través de la interacción y oligomerización de moléculas señalizadoras y proteínas celulares (Huang y col., 2006), así como de servir de andamio dentro de la caveola en la membrana plasmática para procesos de señalización. Adicionalmente, existen evidencias de que la CAV1 puede tener roles independientes de la caveola en la regulación de actividades celulares incluyendo el transporte de lípidos (Fridolfsson y col., 2014). El proceso que sigue la proteína NS1 en su forma dimérica para alcanzar la membrana plasmática, así como que factores celulares pudieran estar implicados en la hexamerización de la forma secretada de la proteína aún se desconocen. Dada la plasticidad de la CAV1, la multifuncionalidad de la NS1 y a la evidencia obtenida de que ambas convergen en la ruta de secreción de lípidos en células de insecto, nos planteamos a futuro realizar ensayos de interacción entre ambas proteínas establecer si CAV1 esta transportando directamente a la NS1 o si solo forma parte del complejo implicado en el proceso de secreción. Estos experimentos deben ser hechos no solo en células de insecto, si no también en células de vertebrados ya que las observaciones de que BMCD afecta la secreción de NS1 en células HEK293 (Gutsche y col., 2011) y que BFA solo afecta parcialmente la secreción de NS1 en células Vero, sugieren que la ruta CCC también es utilizada por NS1 en células de vertebrados infectadas.

En la forma hexamérica de la NS1 los “butter fingers” se ubican dirigidos hacia el canal central de la proteína y la interacción de estos con los lípidos que adquiere la NS1 para conformar su estructura es necesaria para el ensamblaje eficiente y egreso de la NS1 (Gutsche y col., 2011). Por esta razón, también sería interesante investigar a futuro, si la CAV1 pudiera estar orquestando el proceso de hexamerización de la NS1, sirviendo de andamio para la trimerización de la estructura en su paso por la membrana plasmática en el proceso de secreción.

Se ha evidenciado una disminución de lípidos en sangre en los pacientes infectados con DENV y que presentan formas severas de la enfermedad (Biswas y col., 2015). Si la NS1 comparte la ruta de secreción de lípidos que lleva a cabo la CAV1 de manera eficiente, sería interesante esclarecer si esta disminución de lípidos pueda deberse al secuestro parcial de esta vía por parte de la maquinaria viral para la secreción de NS1. Para poder establecer esta relación, se deberá profundizar con experimentos tanto en células de insecto como de vertebrados.

La multiplicidad de roles que se le han atribuido a la proteína NS1, la hace un ejemplo de la economía genética que emplean los flavivirus para poder establecer una infección productiva tanto *in vivo* como *in vitro*. La proteína NS1 está implicada en la evasión de la respuesta inmune del huésped, en diversos procesos que exacerban la patología de la infección por DENV y en la promoción de la replicación del ARN viral, lo que la convierte en un blanco atractivo para el diseño de compuestos antivirales. Sin embargo, a medida que avanzan las investigaciones destinadas a dilucidar las funciones de la NS1, se van abriendo nuevas interrogantes en relación a su biogénesis y dinámica intracelular. El conocer la o las rutas y las proteínas implicadas en el proceso de secreción de la NS1 tanto en células de insecto como de vertebrados, contribuirá a entender cómo se lleva a cabo la modulación de esta proteína y su relación con el proceso de infección del DENV y pudiera crear nuevas estrategias para el desarrollo de antivirales destinados a tratar las formas severas del dengue.

CONCLUSIONES

- La proteína NS1 se secreta eficientemente de células desde insecto infectadas como un hexámero con forma de barril abierto.
- La secreción de NS1 ocurre a través del complejo chaperón de caveolina, la cual es una vía no clásica de secreción, asociada al movimiento de colesterol.
- La proteína NS1 parece establecer asociación directa con la proteína caveolina-1.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la participación del complejo chaperón de caveolina en la secreción de NS1 en células de vertebrados.
- Confirmar la interacción de NS1 con caveolina-1 en células de mosquitos y de vertebrados.
- Evaluar la función de NS1 soluble en el mosquito vector.

REFERENCIAS

Akey DL, Brown WC, Jose J, Kuhn RJ, Smith JL. 2015. Structure-guided insights on the role of NS1 in flavivirus infection. *Bioessays*. 37:489-494.

Akey DL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J, Jurkiw TJ, DelProposto J, Ogata CM, Skiniotis G, Kuhn RJ, Smith JL. 2014. Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science* 343: 881 -885.

Allonso D, Andrade IS, Conde JN, Coelho DR, Rocha DC, da Silva ML, Ventura GT, Silva EM, Mohana-Borges R. 2015. Dengue Virus NS1 Protein Modulates Cellular Energy Metabolism by Increasing Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity. *J Virol*. 89:11871-11883

Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. 2011. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol* 187:424–433.

Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, Atkinson JP. 2010. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med* 207:793–806.

Avirutnan, P, Zhang, L, Punyadee, N, Manuyakorn, A, Puttikhunt, C, Kasinrer, W, Malasit, P, Atkinson, JP, Diamond, MS. 2007. Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. *Plos Path* 3:1798-1812.

Avirutnan, P., Punyadee, N., Noisakran, S., Komoltri, C., Thiemmecca, S., Auethavornanan, K., Jairungsri, A., Kanlaya, R., Tangthawornchaikul, N., Puttikhunt, C. 2006. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis* 193:1078-1088.

Beatty, PR, Puerta-Guardo, H, Killingbeck, SS, Glasner, DR, Hopkins, K, Harris, E. 2015. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med* 7: 304ra141.

Belmares, M., Blanco, M., Goddard W.A., Ross R.B., Caldwell G., Chou H., Pham J., Olofson P.M., Thomas C.J. 2004. Hildebrand and Hansen solubility parameters from molecular dynamics with applications to electronic nose polymer sensors. *J Comput Chem* 25: 1814-1826.

Biswas HH, Gordon A, Nuñez A, Perez MA, Balmaseda A, Harris E. 2015. Lower Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels Are Associated with Severe Dengue Outcome. *PLoS Negl Trop Dis.* 3;9(9):e0003904. doi: 10.1371/journal.pntd.0003904. eCollection 2015 Sep.

Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS. 2012. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1760. doi: 10.1371/journal.pntd.0001760 PMID: 22880140

Byrne D., Dart C., Rigden D. 2012. Evaluating caveolin interactions: do proteins interact with the caveolin scaffolding domain through a widespread aromatic residue-rich motif?. *J Biol Chem* 287: e44879

Ceballos-Olvera I., Chávez-Salinas S., Medina F., Ludert J., del Angel R. JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol. *J Virol* 2010. *Virol* 396:30–36

Cervantes-Salazar M, Angel-Ambrocio AH, Soto-Acosta R, Bautista-Carbajal P, Hurtado-Monzon AM, Alcaraz-Estrada SL, Ludert JE, Del Angel RM. Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: this interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells. *Virology* 484:113-126

Chambers, T., McCourt, D., Rice, C.M. 1990. Production of yellow fever virus proteins in infected cells: identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. *Virology* 177:159-174.

Chuang YC, Lei HY, Lin YS, Liu HS, Wu HL, Yeh TM. 2011. Dengue virus-induced autoantibodies bind to plasminogen and enhance its activation. *J Immunol* 187:6483–6490.

Crooks, A., Lee, J., Easterbrook, L., Timofeev, A., Stephenson, J. 1994. The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. *J Gen Virol* 75:3453-3460.

Crooks, A., Lee, J., Dowsett, A., and Stephenson, J. 1990. Purification and analysis of infectious virions and native non-structural antigens from cells infected with tick-borne encephalitis virus. *J Chromatogr* 502: 59-68.

Cutrona M.B., Beznoussenko G.B., Fusella A., Martella O., Moral P., Mironov A. A. 2013. Silencing of Mammalian Sar1 Isoforms Reveals COPII-Independent Protein Sorting and Transport. *Traffic*. 14: 691–708

Falconar AK. 1997. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol* 142:897–916.

Falgout, B., Chanock, R., Lai, C. 1989. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. *J Virol* 63:1852-1860.

Falgout, B., Bray, M., Schlesinger, J., Lai, C. 1990. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural

protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J Virol* 64:4356-4363.

Falgout, B., Markoff, L. 1995. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 69:7232-7243.

Fischl W., Bartenschlager R. 2011. Exploitation of cellular pathways by Dengue virus. *Current Opinion in Microbiology* 14:1-6.

Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F.A., Deubel, V. 1999. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* 73:6104-6110.

Fridolfsson HN, Roth DM, Insel PA, Patel HH. 2014. Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. *FASEB J* 28:3823-3831.

Guzman M.G., Harris E. Dengue. 2015. *Lancet* 31:453-465.

Gutsche I., Coulibaly F., Voss J., Salmon J., d'Alayer J., Ermonval M., Larquet E., Charneau P., Krey T., Megret F., Guittet E., Rey F. 2011. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *PNAS*. 108:8003-8008.

Henchal, E., Henchal, L., and Schlesinger, J. 1988. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J Gen Virol* 69:2101-2107.

Jacobs M.G., Robinson P.J., Bletchly C., Mackenzie J.M., Young P.R. 2000. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J* 14:1603-1610.

Junjhon J., Pennington, J.G., Edwards, T.J., Perera, R., Lanman, J., Kuhn, R.J. (2014). Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. *J Virol* 88, 4687–4697.

Kaplan, M. R., and Simoni, R. D. (1985) Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane, *J. Cell Biol.* 101: 446-453.

Keelapang P, Sriburi R, Supasa S, Panyadee N, Songjaeng A, Jairungsri A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Malasit P, Sittisombut N. 2004. Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric dengue viruses. *J Virol* 78:2367-81.

Kuberski T. 1979. Fluorescent antibody studies on the development of dengue-2 virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 16:343-349.

Kudelko M, Brault J, Kwok K, Li M, Pardigon N, Peiris J, Bruzzone R, Desprès P, Nal B, Wang P. 2012. Class II ADP-ribosylation Factors Are Required for Efficient Secretion of Dengue Viruses. *J Biol Chem* 287:767-77.

Leblois, H., Young, P. 1995. Maturation of the dengue-2 virus NS1 protein in insect cells: effects of downstream NS2A sequences on baculovirus-expressed gene constructs. *J Gen Virol* 76: 979-984.

Leblois, H., Young, P. 1993. Sequence of the dengue virus type 2 (strain PR-159) NS1 gene and comparison with its vaccine derivative. *Nucleic Acids Res* 21.

Lin Y.S., Yeh T.M., Lin C.F., Wan S.W., Chuang Y.C., Hsu T.K., Liu H.S., Liu C.C., Anderson R., Lei H.Y. 2011. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 236:515–523.

Ludert, J., Mosso, C., Ceballos-Olvera, I., del Angel, R.M. 200). Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. *Viol J* 5:51.

Mackenzie, J., Jones, M., Young, P. 1996. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 220:232-240.

Mandl C., Heinz F, Stöckl E, Kunz C. 1989. Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. *Virology* 173:291-301.

Martina BEE, Koraka, P, Osterhaus, ADME. 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* 22: 564-581.

Mason, P. 1989. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology* 169:354-364.

Material Studio. Accelrys Inc. San Diego; 2011.

Muller, E. y Schekman R. 2013. COPII – a flexible vesicle formation system. *Curr Opin Cell Biol.* 25: 420–427

Muller D., Young P. 2012. The Many Faces of the Flavivirus Non-structural Glycoprotein NS1. Chapter 4, “Molecular Virology and Control of Flaviviruses” eds, Pei-Yong Shi & Mark Schreiber. Horizon Scientific Press.

Modhiran, N, Watterson, D, Muller, DA, Panetta, AK, Sester, DP, Liu, L, Hume, DA, Stacey, KJ, Young, PR. 2015. Dengue virus NS1 protein activate cells via toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med* 7: 304ra142.

Nebenführ A, Ritzenthaler C, Robinson DG. 2002. Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol.* 130:1102-8.

Nickel W., Rabouille C. 2009. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev.* 10:148-156

Nguyet M.N., Duong T.H., Trung V.T., Nguyen T.H., Tran C.N., Long V.T., Dui le T., Nguyen H.L., Farrar J.J., Holmes E.C., Rabaa M.A., Bryant J.E., Nguyen T.T., Nguyen H.T., Nguyen L.T., Pham M.P., Nguyen H.T., Luong T.T., Wills B., Nguyen C.V., Wolbers M., Simmons C.P. 2013. Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. PNAS. 110 : 9072-9077.

Noisakran S., Dechtawewat T., Avirutnan P., Kinoshita T., Siripanyaphinyo U., Puttikhunt C., Kasinrerak W., Malasit P., Sittisombut N., 2008. Association of dengue virus 4 NS1 protein with lipid rafts. J. Gen. Virol. 89, 2492-2500.

Nowak, T., Farber, P., Wengler, G. 1989. Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. Virol 169:365-376.

Parrish, C., Woo, W., and Wright, P. 1991. Expression of the NS1 gene of dengue virus type 2 using vaccinia virus. Dimerisation of the NS1 glycoprotein. Arch Virol 117:279-286.

Perdew J P, Wang Y. Phys Rev B 1992. 45: 13244-13249.

Pethel, M., Falgout, B., Lai, C.J. 1992. Mutational analysis of the octapeptide sequence motif at the NS1-NS2A cleavage junction of dengue type 4 virus. J Virol 66:7225-7231

Poungsawai J., Kanlaya R., Pattanakitsakul S.N., Thongboonkerd V., 2011. Subcellular localizations and time-course expression of dengue envelope and non-structural 1 proteins in human endothelial cells. Microbiol. Pathog. 51: 225- 229

Pryor, M., Wright, P. 1994. Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. J Gen Virol 75:1183-1187.

Pryor, M., Wright, P. 1993. The Effects of Site-Directed Mutagenesis on the Dimerization and Secretion of the NS1 Protein Specified by Dengue Virus. *Virology* 194:769-780.

Ramírez A, Fajardo A, Moros Z, Gerder M, Caraballo G, Camacho D, Comach G, Alarcón V, Zambrano J, Hernández R, Moratorio G, Cristina J, Liprandi F. 2010. Evolution of dengue virus type 3 genotype III in Venezuela: diversification, rates and population dynamics. *Virol J.* 7:329.

Rice C., Lenches E., Eddy S., Shin S., Sheets R., Strauss J. 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229:726-33.

Smith G., Wright P. 1985. Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected vero and *Aedes albopictus* cells. *J Gen Virol* 66:559-71.

Salazar M, Richardson J., Sanchez-Vargas I., Olson K., Beaty B. 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol*, 7(9)

Scaturro P, Cortese M, Chatel-Chaix L, Fischl W, Bartenschlager R. 2015. Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS Pathog* 11:e1005277

Schlesinger, J., Brandriss, M.W, Putnak, J., Walsh, E. 1990. Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody. *J Gen Virol* 71:593-599.

Schlesinger, J., Brandriss, M., Walsh, E. 1987. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol* 68:853-857.

- Smart E., Ying Y., Donzell W., Anderson R.G. 1996. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 271: 29427-29435.
- Somnuk P., Hauhart R., Atkinson J. 2011. N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement. *Virology* 413:253-264.
- Sreenivasan V., Ng K.L., Ng Lee M. Brefeldin A affects West Nile Virus replication in Vero cells but not C6/36 cells. 1993. *J Virol Meth.* 45:1-17
- Sun, D., King, C., Huang, H., Shih, Y., Lee, C., Tsai, W., Yu, C., Chang, H. 2007. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J Thromb Haemost* 5:2291-2299.
- Sun, H. 2008.COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds. *J. Phys. Chem. B* 102:7338-7364.
- Umashankar M., Sanchez-San Martín C., Liao M., Guo A., Taylor G., Kielian, M. 2008. Differential cholesterol binding by class II fusion proteins determines membrane fusion properties. *J Virol* 82:9245-9253.
- Urbani, L., and Simoni, R. D. (1990) Cholesterol and vesicular stomatitis virus G protein take separate routes from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J Biol.Chem.* 265: 1919-1923.
- Van mai C. 2009.Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. *Virology* March 6:35
- van Panhuis W.G., Choisy M., Xiong X., Chok N.S., Akarasewi P., Iamsirithaworn S., Lam S.K., Chong C.K., Lam F.C., Phommasak B., Vongphrachanh P., Bouaphanh K., Rekol H., Hien N.T., Thai P.Q., Duong T.N., Chuang J.H., Liu Y.L.,

Ng L.C., Shi Y., Tayag E.A., Roque V.G. Jr, Lee Suy L.L., Jarman R.G., Gibbons R.V., Velasco J.M., Yoon I.K., Burke D.S., Cummings D.A. 2015. Region-wide synchrony and traveling waves of dengue across eight countries in Southeast Asia. *PNAS*. 112:13069-13074

Voge N.V., Sánchez-Vargas I., Blair C.D., Eisen L., Beaty B.J. 2013. Detection of dengue virus NS1 antigen in infected *Aedes aegypti* using a commercially available kit. *Am J Trop Med Hyg*. 88:260-266.

Wallis, T., Huang, C., Nimkar, S., Young, P., Gorman, J. 2004. Determination of the disulfide bond arrangement of dengue virus NS1 protein. *J Biol Chem* 279:20729-20741.

Watanabe S., Tan K.H., Rathore A.P., Rozen-Gagnon K., Shuai W., Ruedl C., Vasudevana S.G. (2012). The Magnitude of Dengue Virus NS1 Protein Secretion Is Strain Dependent and Does Not Correlate with Severe Pathologies in the Mouse Infection Model. *J Virol* 86, 5508–551.

Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck C., Walther P, Fuller S., Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*. Apr 23:365-75.

Winkler, G., Maxwell, S., Ruemmler, C., Stollar, V. 1989. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology* 171:302-305.

Weaver S. y Reisen W. 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res*.85:328-345

Westaway, E., Goodman, M.R. 1987. Variation in distribution of the three flavivirus-specified glycoproteins detected by immunofluorescence in infected Vero cells. *Arch Virol* 94:215-228.

Westaway, E., Mackenzie, J., Kenney, M., Jones, M., Khromykh, A. 1997. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol* 71:6650-6661.

Winkler, G., Randolph, V.B., Cleaves, G.R., Ryan, T.E., and Stollar, V.1988. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology* 162:187-196.

Wright P., Cauchi M., Ng M. 1989. Definition of the carboxy termini of the three glycoproteins specified by dengue virus type 2. *Virology*. 171:61-7.

Youn S, Li T, McCune BT, Edeling MA, Fremont DH, Cristea IM, Diamond MS. 2012. Evidence for a genetic and physical interaction between nonstructural proteins NS1 and NS4B that modulates replication of West Nile virus. *J Virol* 86: 7360–7371

Youn S, Cho H, Fremont DH, Diamond MS. 2010. A short N-terminal peptide motif on flavivirus nonstructural protein NS1 modulates cellular targeting and immune recognition. *J Virol*. 84:9516-32.

