



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA
Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**Participación de las proteínas Calmodulina y
Calreticulina durante la infección por Dengue**

TESIS

Que presenta

M. en C. PATRICIA BAUTISTA CARBAJAL

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

Directora de Tesis:

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

México D.F.

Enero, 2017

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 8 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN bajo la tutoría de la Dra. Rosa María del Ángel y la asesoría del Dr. Juan E. Ludert, Dr. José Tapia, Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y Dra. Sofía Lizeth Alcaraz Estrada.

Durante el presente trabajo se contó con el apoyo del CONACyT del que Patricia Bautista Carbajal fue becaria con No. de registro 371635.

Agradecemos el apoyo de esta institución.

Agradezco al CINVESTAV por haberme aceptado y abrirme las puertas de su seno científico, así como también a los diferentes investigadores que brindaron su apoyo para seguir adelante día a día.

Agradezco también a mi Directora de Tesis la Dra, Rosa Ma. Del Ángel por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, además de haber sido mi guía durante este proceso.

También agradezco a mis compañeros, ya que gracias a su amistad y apoyo se han afianzado mis ganas de seguir adelante.

Finalmente agradezco a mi familia que siempre me apoyó incondicionalmente y me acompañó a cada paso del camino.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción.....	3
Situación actual de la enfermedad.....	3
Manifestaciones clínicas de la enfermedad	4
Generalidades del virus	5
Proteínas virales	5
Proteínas estructurales	5
Proteínas no estructurales	7
Ciclo replicativo viral	10
Entrada, fusión y decapsidación de la partícula	10
Replicación del RNA viral.....	11
Ensamblaje, maduración y liberación del DENV	12
Proteínas dependientes de calcio.....	13
Calreticulina	13
Calmodulina	14
Calcio y virus	14
Proteínas dependientes de calcio y Dengue.....	15
Justificación.....	16
Hipótesis.....	17
Objetivo general	17
Objetivos Particulares	17
Metodología.....	18

Células y virus	18
Infección de células Huh7 y Tratamientos	18
Pruebas de viabilidad Celular	19
Pruebas de proliferación Celular.....	19
Obtención de extractos proteicos totales.....	19
Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	20
Western-blot	20
Análisis densitométrico	20
Extracción de RNA	21
Tratamiento con DNAsa	21
Síntesis de cDNA.....	21
PCR tiempo real	21
Determinación de localización subcelular y porcentaje de infección mediante Microscopía confocal y Citometría de flujo	22
Determinación de la Progenie viral y secreción de NS1	23
Actividad de Luciferasa.....	23
Identificación del sitio de unión Putativo de CaM a NS2A	23
Docking.....	23
NS2A construcción, expresión y purificación de la proteína recombinante	24
Cromatografía de afinidad de NS2A	24
Precipitación de proteínas de sobrenadante.....	24
Resultados	26
W7 inhibe la infección por DENV.....	26
W7 inhibe la formación de complejos de replicación.	39
W7 mostró un sitio de interacción putativa con la proteasa de DENV.	42

La proteína viral NS2A tiene un sitio de interacción putativo con CaM.....	43
Calreticulina colocaliza con la proteína E en células Infechadas.....	46
Calreticulina aumenta su expresión y se secreta en células infectadas.	47
Discusión.....	48
Conclusiones.....	54
Perspectivas.....	55
Referencias.	56

Resumen

El virus dengue (DENV) pertenece a la familia Flaviviridae, género Flavivirus. A la fecha se conocen cuatro serotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 que contienen como genoma un RNA de polaridad positiva que codifica para 3 proteínas estructurales (C, prM y E) y 7 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5). Se ha descrito que la replicación de DENV ocurre en estrecha asociación con membranas, en especial derivadas de retículo endoplásmico (RE). La asociación de los complejos de replicación con el RE ha llamado la atención sobre la interacción de DENV con proteínas dependientes de calcio dado que la homeóstasis de este ión en RE. Es bien sabido que el calcio actúa como segundo mensajero uniéndose a proteínas sensoras de calcio como la Calmodulina (CaM), cuya función es traducir un modesto aumento del calcio intracelular en una respuesta fisiológica en todas las células eucariotas y la Calreticulina (CRT) cuya función más conocida es como chaperona en RE. En el virus de la inmunodeficiencia humana, se ha descrito que CaM se une al dominio citosólico de la glicoproteína de la envoltura viral. Por otro lado, se ha descrito que CRT participa en la inhibición de la respuesta inmune durante la infección por el virus de hepatitis B. Hasta el día de hoy no había sido considerada su función durante la infección por DENV, sin embargo nuestros hallazgos sugieren que CaM es una molécula importante en el ciclo replicativo viral. Esta sugerencia obedece a que la presencia del antagonista de CaM, W7, durante la infección por DENV, se traduce en una disminución del título viral en PFU's, una reducción de la proteína viral NS1 secretada y una reducción en la actividad de luciferasa cuando se utilizan células transfectadas establemente con el Replicón de dengue; Además nuestros resultados muestran que existe una posible interacción entre la proteína NS2A del virus y Calmodulina sugiriendo que esta proteína participa en el ciclo replicativo viral. Con respecto a CRT, se observa un aumento en su expresión durante la infección por DENV además de mostrar relocalización hacia los complejos replicativos; por otra parte encontramos que esta proteína se secreta durante la infección sugiriendo que podría tener otras funciones además de su función como chaperona.

Abstract

Dengue is the most important arthropod-borne viral disease in global public health. The dengue virus (DENV) belongs to the family Flaviviridae, genus Flavivirus. To date, it has been described four serotypes DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 which contain a positive polarity RNA genome encoding 3 structural proteins (C, prM and E) and 7 non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5). It has been reported that DENV replication occurs in close association with membranes, in particular, derived from the endoplasmic reticulum (ER). The association of replication complexes with ER has drawn attention to the interaction of DENV with calcium dependent proteins, since the homeostasis of this ion in ER is very important to maintain cellular viability. It is well known that calcium acts as a second messenger by binding to calcium sensing proteins such as calmodulin (CaM). This protein function is to translate a modest increase in intracellular calcium into a physiological response in all eukaryotic cells. On the other hand, calreticulin (CRT) is a chaperone in RE. In the human immunodeficiency virus, CaM has been reported to bind to the cytosolic domain of the viral envelope glycoprotein. This binding inhibits all those calmodulin-dependent proteins. In the case of CRT, it has been reported that it participates in the inhibition of the immune response during hepatitis B virus infection. At present the role of both proteins during DENV infection is unknown. Our results suggest that CaM is an important molecule in the viral replicative cycle because in the presence of the CaM antagonist, W7 causes a decrease in viral titer, a reduction in NS1 secretion, and a reduction in luciferase activity when cells stably transfected with dengue Replicon were used. In addition, our results show that there is a possible interaction between the viral protein NS2A with CaM, suggesting that this protein participates in the viral replicative cycle. With respect to CRT, there is an increase in CRT expression during DENV infection and it is relocated to the viral replicative complexes. Additionally, CRT is secreted during infection suggesting that it could have other functions in DENV pathogenesis.

Introducción

Situación actual de la enfermedad

El Dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos que más rápidamente se extiende en el mundo. En los últimos 50 años la incidencia de dengue se incrementó 30 veces con una expansión geográfica hacia nuevos países. Se estima que de 50 a 100 millones de casos ocurren anualmente. De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS) el sureste de Asia y regiones al suroeste del Pacífico reportan casi el 75% de los casos totales de la enfermedad (OMS, 2009). Así, la infección producida por el virus del dengue (DENV) inflige una significativa carga de salud, económica y social en todas las áreas endémicas. Globalmente, el número de años de vida potencialmente perdidos (DALYs) por el Dengue está estimado entre 528 y 621 por millón de personas (OMS, 2009), con un promedio anual de 574,000 casos reportados, cuyo costo económico para 8 países en América y Asia es de al menos \$587 millones de dólares (Suaya et al., 2009).

Actualmente, como consecuencia de la expansión de la distribución geográfica de los 4 serotipos del virus y del mosquito vector, la frecuencia de epidemias y la emergencia de dengue severo en nuevas áreas se ha incrementado. Las razones de expansión son complejas y están vinculadas a la combinación de factores múltiples como el aumento del crecimiento poblacional, mal control del vector, cambios genéticos en virus circulantes o introducidos y modulación de factores climáticos (Wilder-Smith and Gubler, 2008). Lo anterior ha condicionado a que la OMS haya clasificado al dengue como un importante problema de salud pública internacional, (Wilder-Smith et al., 2010).

En México, según las estadísticas que presenta la Dirección General de Epidemiología en su Publicación de la Semana Epidemiológica N° 46 al 21 de Noviembre de 2016; para 2015 se confirmaron en total 22,506 casos de fiebre del Dengue, mientras que en lo que va del 2016 se han confirmado 15,846 casos.

Manifestaciones clínicas de la enfermedad

Después de un periodo de incubación que va de 3 a 7 días después de la inoculación del virus por la picadura de un mosquito, aparecen los síntomas repentinamente y la enfermedad pasa por 3 fases, una fase febril inicial, una fase severa que se desarrolla al tiempo que la fiebre desaparece y una última fase de recuperación espontánea. (P. Simmons et al., 2012).

La fase febril en un individuo se caracteriza por la presencia de fiebre mayor a los 38°C, acompañada de dolor de cabeza, vómito, mialgia, dolor articular y en algunas ocasiones erupción macular transitoria. En los niños se presenta fiebre elevada pero manifiestan menos síntomas que los adultos, esta fase perdura por un periodo de 3 a 7 días después de los cuales el paciente se recupera sin presentar complicaciones (Simmons et al. 2012).

En algunos pacientes en general niños y adultos jóvenes puede desarrollarse una fase severa durante la cual ocurre una fuga vascular sistémica. Esta fase es evidenciada por el aumento de la hemoconcentración, hipoproteinemia, derrame pleural y ascitis. Durante la transición de la fase febril a la fase crítica, entre los días 4 y 7 de la enfermedad, es crucial ser conscientes de las señales de advertencia que indican que la permeabilidad vascular se está alterando en el paciente. Estos signos incluyen vómito persistente, dolor abdominal severo, hepatomegalia, una rápida disminución en el recuento de plaquetas y hemorragia de las mucosas. Las manifestaciones hemorrágicas son más frecuentes durante este período crítico. En algunos casos menos frecuentes se producen otras manifestaciones graves, incluyendo fallo hepático, miocarditis y encefalopatía, a menudo con una fuga mínima de plasma asociado.

La permeabilidad vascular alterada dura poco, volviendo espontáneamente a un nivel normal después de un periodo que va de 48 a 72 horas, y es concurrente con una rápida mejoría de los síntomas del paciente. Una segunda erupción puede aparecer durante la fase de recuperación, que va desde una erupción maculopapular leve a una lesión grave. Los adultos pueden tener un profundo cansancio durante varias semanas después de la recuperación (Simmons et al. 2012).

Generalidades del virus

El virus del Dengue (DENV) pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. A la fecha se han descrito cuatro serotipos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 (Martina et al., 2009). DENV es un virus envuelto, de simetría icosaédrica, con un genoma de RNA de polaridad positiva y cadena sencilla con un solo marco de lectura abierto cuya traducción produce una poliproteína que es procesada co- y postraduccionalmente y que codifica para 3 proteínas estructurales (C, prM y E) y 7 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Lindenbach et al. 2003). Su genoma tiene un CAP en el extremo 5' y no está poliadenilado en el extremo 3'.

La síntesis de proteínas virales ocurre a partir de la traducción del RNA genómico que funge como RNAm; después de que las proteínas virales se producen, el RNA deja de traducirse para dar paso a su replicación o síntesis de RNA, que ocurre en dirección 5' a 3' por circularización del RNA. Se ha descrito que la replicación del RNA ocurre en asociación con estructuras membranosas intracelulares inducidas por el virus que envuelven la maquinaria de replicación del RNA llamadas complejos de replicación y contienen proteínas virales, RNA viral y factores de la célula hospedera (Mackenzie, 2005; Miller and Krijnse-Locker, 2008; Salonen et al., 2005). Específicamente, DENV es traducido y replicado en asociación con las membranas derivadas del retículo endoplásmico (RE) (Clyde et al., 2006)

Proteínas virales

Proteínas estructurales

Los genes que codifican para las proteínas estructurales de DENV se encuentran en el extremo 5' del genoma y comprenden un poco más de una cuarta parte del RNA viral (Mason et al., 1987).

Proteína C.

La proteína de la cápside, también conocida como proteína *core* o de la cápside, pesa 11 kDa, aproximadamente. Su estructura secundaria consiste en cuatro hélices alfa que cumplen diferentes funciones: las hélices 3 y 4 son hidrofóbicas y se encargan de anclar a la proteína a la membrana del RE. La hélice 1, está ubicada en el extremo N-terminal de la proteína y orientada hacia el citoplasma, posee aminoácidos de carácter básico que se asocian y unen fuertemente al RNA genómico recién sintetizado. Así, se forma el complejo ribonucleoprotéico o nucleocápside que protege al RNA viral de la degradación y promueve la organización del RNA en el interior de la partícula viral en formación. La nucleocápside se estabiliza por la interacción de varios homodímeros antiparalelos de la proteína C, que rodean con gran afinidad y especificidad a la hebra de RNA viral (Schneemann, 2006). La hélice 2 posee una naturaleza muy hidrofóbica que interviene durante el ensamblaje de la ribonucleoproteína y de la partícula viral. En el primer caso, actúa como una bisagra para favorecer el acercamiento del RNA viral al resto de la proteína C anclada en la membrana del RE. Por otro lado, la hélice 2 recluta pequeñas gotas lipídicas (*lipid droplets*), presentes en el citoplasma, que promueven la formación de la partícula viral (Samsa et al., 2009). Además, la proteína de la cápside anclada en el RE interactúa con las proteínas precursora de membrana (prM) y de envoltura, para favorecer y completar el ensamblaje de las partículas virales (Lindenbach et al. 2001; Lixin Ma et al. 2004; Urbanowski et al. 2008).

Proteína precursora de membrana (prM) y proteína de membrana (M)

La proteína precursora de membrana (prM) tiene un peso molecular de 26 kDa y está presente en los viriones inmaduros y junto con la proteína M, participa fundamentalmente en el proceso de maduración de la partícula viral. La proteína precursora de membrana es procesada después de la interacción por la proteasa celular furina, que la procesa en dos y genera, al péptido pr, y a la proteína M, de un peso molecular de 8 kDa (Lindenbach et al. 2001; Y. Zhang et al. 2003). La proteína tiene dos dominios transmembrana y un ectodominio de aproximadamente 40 aminoácidos. Este último, puede inducir apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales (Catteau et al., 2003).

Proteína de envoltura E

La proteína de envoltura tiene un peso molecular de 50 kDa, posee tres dominios denominados I, II y III, y se distribuye sobre la superficie del virus, formando complejos homodiméricos de tipo cabeza-cola. Los dominios II y III de cada una de las proteínas del homodímero son determinantes para las interacciones entre el virus y los receptores de las células susceptibles. Por otra parte, la glicoproteína E es el principal inmunógeno del virus, por lo tanto estimula la respuesta inmune del individuo e induce la producción de anticuerpos neutralizantes. La importancia funcional de la proteína E radica en que es la única proteína viral que interactúa con las moléculas receptoras de la membrana plasmática de las células permisivas favoreciendo la endocitosis del virus. Por lo tanto, las mutaciones y modificaciones post-traduccionales que sufre esta proteína en cada ciclo de replicación, pueden afectar directamente la eficiencia de la replicación, la virulencia y el tropismo del DENV, al igual que puede regular el establecimiento y el control de la infección por parte del sistema inmune del huésped (McBride et al. 2000; Imbert et al. 1994; Allison et al. 1995; Hung et al. 1999; Lee et al. 2000; Lin et al. 2002; Zhang et al. 2004; Stiasny et al. 2006).

Proteínas no estructurales

NS1

Es una proteína de 46 kDa que forma dímeros o hexámeros asociados a balsas lipídicas (*rafts*) de la membrana plasmática (Noisakran et al., 2008). También, se puede encontrar soluble en el citoplasma y en el espacio extracelular por lo que la NS1 puede estimular al sistema inmune. Varios autores han demostrado en el suero de pacientes infectados con DENV o con el virus de encefalitis japonesa (JVE), la presencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína NS1. Estos sueros se han evaluado *in vitro* y se ha demostrado que las inmunoglobulinas (Ig) contra la proteína NS1 de ambos virus pueden estimular la lisis mediada por el complemento y dependiente de anticuerpos, tanto en células

infectadas como no infectadas (Lin et al. 2002; Avirutnan et al. 2007; Schlesinger 2006; Krishna et al. 2009).

NS2A

Es una proteína de 22 kDa, aproximadamente, que *in vitro* promueve el ensamblaje y la replicación viral. Al parecer, la NS2A coordina de un modo aún no muy bien definido, si el RNA genómico producido en cada ciclo de replicación se utiliza como nuevo molde para generar las formas replicativas y los intermediarios replicativos o si se asocia dentro de la nucleocápside durante el ensamblaje viral (Lindenbach and Rice, 2001). Además está involucrada en la inhibición de la respuesta a interferón (Muñoz-Jordán et al., 2003).

NS2B

Es una proteína de 14 kDa que posee una región hidrofóbica que se ancla a la membrana del RE y un pequeño dominio hidrofílico que es liberado por procesamiento proteolítico e interactúa con el dominio proteasa de la proteína NS3 para actuar como cofactor (Bollati et al., 2010; Lindenbach and Rice, 2003, 2001).

NS3

Es una proteína de 70 kDa que posee en el extremo N-terminal un dominio proteasa similar a la tripsina y en el extremo C-terminal un dominio con diferentes actividades enzimáticas, que actúa como trifosfatasa de nucleótidos estimulada por RNA y como helicasa del RNA; ambas funciones son indispensables en la replicación viral (Bazan and Fletterick, 1989; Chambers et al., 1990). El dominio proteasa actúa hidrolizando los complejos NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5 de la poliproteína. NS2B, le confiere estabilidad durante su actividad proteolítica, mientras que la función helicasa permanece inhibida. Recientemente, se ha encontrado que la proteína NS3 es la encargada de generar el ambiente lipídico apropiado alrededor del RE, al reclutar enzimas celulares de la vía de síntesis de lípidos, lo cual garantiza el inicio del ensamblaje (Heaton et al., 2010). La otra función de la proteína NS3 es actuar como helicasa, desenrollando las estructuras secundarias que se forman en el extremo 3' del RNA viral, para

favorecer la unión de la polimerasa NS5 y el RNA y dar inicio a la replicación (Bollati et al., 2010).

NS4A y 4B

Las proteínas no estructurales 4A y 4B son las proteínas integrales de membrana de DENV que cumplen múltiples funciones tanto en la replicación DENV como en las interacciones virus-hospedero.

A través de la comunicación molecular con NS4A la proteína celular Vimentina regula la formación del complejo de replicación de DENV (Teo and Chu, 2014). Tanto NS4A y NS4B son elementos cruciales en el complejo de replicación asociado a la membrana de Retículo Endoplásmico (Nemésio et al., 2012; Zou et al., 2015). La estructura de la proteína NS4A contiene 127 aminoácidos y posee 2 dominios transmembrana (Miller et al., 2007; Nemésio et al., 2012), Se ha descrito que el primer dominio, de 48 aminoácidos, se encuentra implicado en la formación de una hélice anfipática que participa en la oligomerización (Stern et al., 2013). Por su parte la proteína NS4B está compuesta de 248 aminoácidos y posee 3 dominios transmembrana (Miller et al., 2006). Se ha reportado que NS4B interactúa con el dominio helicasa de NS3 y lo disocia del ARN de una sola cadena en DENV (Umareddy et al., 2006).

Una región de NS4A, de 40-76 aminoácidos, interactúa con una región de NS4B, de 84-146 aminoácidos. Un estudio de análisis funcional mostró que esta interacción tiene una correlación con la replicación viral demostrando la importancia biológica de la interacción NS4A-NS4B. Mutaciones en estas secuencias de aminoácidos impiden la interacción de NS4A Con NS4B, lo que conduce a la inhibición de la replicación (Naik and Wu, 2015; Zou et al., 2015).

NS5

Es la proteína más conservada entre todos los flavivirus. Esta proteína es multifuncional, ya que el extremo N-terminal posee actividad enzimática de metiltransferasa y guanidiltransferasa, responsables del *capping* y la metilación del extremo 5' del RNA genómico, mientras que, en el extremo C-terminal, se ubica el dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA (Egloff et al., 2002). Por lo tanto,

la proteína NS5 actúa como la única polimerasa durante la replicación y transcripción viral. Aunque estos procesos suceden exclusivamente en el citoplasma de la célula infectada, se ha identificado que NS5 posee una señal de localización nuclear que facilita su importe al núcleo; sin embargo, la razón y la función de la NS5 en el núcleo no se conocen (Bollati et al., 2010; Muñoz-Jordán et al., 2003; Nomaguchi et al., 2003). Muy recientemente se ha descrito que NS5 interacciona con proteínas de splicing interfiriendo en la maduración y el transporte de RNAs celulares (De Maio et al., 2016).

Ciclo replicativo viral

Entrada, fusión y decapsidación de la partícula

La entrada del virus tanto en células de mamífero como de mosquito se inicia con el acercamiento del DENV a la superficie de la célula. La proteína E interactúa con proteínas o proteoglicanos de la membrana celular que median la unión y la posterior endocitosis del virus (Allison et al., 1995; Hung et al., 1999; Zhang et al., 2003). Experimentalmente, se ha demostrado que el dominio III de la proteína E interactúa con el receptor para laminina LAMR1 (Tio et al., 2005), la proteína de adhesión celular ICAM-3 o DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin, CD209*) (Tassaneetrithep et al., 2003) y con proteoglicanos como el heparán sulfato (Germi et al., 2002), entre otras moléculas. Estos hallazgos parecen indicar que, dependiendo del tipo celular, los diferentes serotipos virales pueden utilizar diferentes moléculas receptoras. La participación de un correceptor para la infección por DENV, podría explicar por qué este virus puede infectar diferentes tipos celulares (Diamond et al., 2000), pues este mecanismo le permitiría al virus interactuar inicialmente con el heparán sulfato presente en casi todos los tipos celulares y luego asociarse con un receptor, que promueva la endocitosis que es un evento dependiente de clatrina. Luego, la vesícula endocítica se transforma en un endosoma temprano y posteriormente en un endosoma tardío, el cual acidifica el pH de la vesícula. El cambio de pH induce los cambios de conformación del dominio II de la proteína E, que favorecen la exposición y el anclaje inmediato del péptido de fusión a la

membrana de la vesícula, lo que conlleva finalmente a la liberación de la nucleocápside al citoplasma (Cunningham and Fujinami, 1999; Mosso et al., 2008; Van Der Schaar et al., 2008, 2007).

Replicación del RNA viral

Cuando la nucleocápside se encuentra libre en el citoplasma, se inician los procesos de traducción y replicación del RNA (Qi et al., 2008; Urbanowski et al., 2008). El RNA genómico es traducido y posteriormente la poliproteína es procesada en el RE por proteasas celulares y virales, que libera de forma ordenada a las tres proteínas estructurales y a las siete proteínas no estructurales encargadas de la replicación del genoma y el ensamblaje viral (Lindenbach and Rice, 2001).

La replicación del RNA viral es un proceso que no está totalmente entendido; sin embargo, por ensayos *in vitro* se han detectado tres especies de RNA, denominadas RNA de 20S, 20/28S y 40S, según el valor del coeficiente de sedimentación. Los RNA de 20S conocidos como formas de replicación, no son degradados por las RNAsas y están constituidos por dos cadenas de RNA cada una con polaridad complementaria (negativa y positiva). La existencia de las formas replicativas sugiere que estas formas incluyen los intermediarios negativos que actúan como molde para la generación de los RNA de sentido positivo. El otro tipo de RNA, los heterogéneos de 20 a 28S, son denominados intermediarios de replicación y corresponden a hebras de RNA de sentido positivo en proceso de alargamiento. Por último, los RNA de 40S pueden ser degradados por RNAsas y, al parecer, es el RNA genómico encontrado en los virus ensamblados; por lo tanto, estos RNAs pueden ser utilizados para la traducción proteica o para conformar, junto con la proteína C la ribonucleoproteína de los nuevos viriones (Lindenbach and Rice, 2001). Durante la traducción, el polipéptido recién sintetizado es acompañado por las proteínas chaperonas BiP, calnexina y calreticulina; luego, cada una de las proteínas virales se organiza en la membrana del RE y es procesada por proteasas como la furina o la NS3, para finalmente ser modificadas después de la traducción (plegamiento y glicosilación) (Bollati et al., 2010; Limjindaporn et al., 2009; Qi et al., 2008).

Ensamblaje, maduración y liberación del DENV

Los mecanismos que promueven, regulan y coordinan el ensamblaje del virus, no se conocen completamente; sin embargo, por microscopía electrónica y criomicroscopía, se ha sugerido que el proceso de ensamblaje de las partículas del DENV sucede en distensiones del retículo endoplásmico denominadas membranas convoluscentes donde ocurre de forma simultánea la traducción de la proteína y el ensamblaje del virus (Welsch et al., 2009).

El proceso de ensamblaje comienza con la formación de la nucleocápside debido a la interacción del RNA genómico y la proteína C en presencia de pequeñas gotas de lípidos (Samsa et al., 2009); sobre esta primera estructura se asocian a continuación las proteínas prM/M y E, que deben estar inmersas en la membrana del RE. Posteriormente, suceden dos etapas de maduración de la partícula viral; primero se organizan de forma heterodimérica las proteínas prM/M y E, en donde la primera recubre a la segunda; este recubrimiento le confiere un aspecto rugoso a la superficie del virus cuando se observa por microscopía electrónica. En el segundo paso, esta partícula inmadura transita desde el RE hasta las regiones *cis* y *trans* del aparato de Golgi, donde se inicia la segunda etapa de maduración.

En esta última etapa, los cambios de conformación y de rotación de la proteína E generan homotrímeros antiparalelo, lo que le da una apariencia lisa a la superficie del virus. Por último, un nuevo procesamiento proteolítico sobre la proteína prM/M por la proteasa furina, independiza al péptido pr y la proteína M. Esta nueva modificación estabiliza los homotrímeros de E y mantiene unido al péptido pr (Keelapang et al., 2004).

Finalmente, cuando el virus es liberado, el pH neutro del espacio extracitoplásmico induce el desprendimiento del péptido pr y la proteína E adquiere la conformación final que puede ser reconocida por las moléculas receptoras de la célula sensible e iniciar un nuevo ciclo de infección en otra célula (Elshuber et al., 2003; Heaton et al., 2010; Jones et al., 2003; Kiermayr et al., 2004; Perera et al., 2008; Perera and Kuhn, 2008; Qi et al., 2008; Urbanowski et al., 2008; Wang et al., 2004).

Proteínas dependientes de calcio

El calcio es un átomo capaz de modificar la conducta celular porque modifica una gran variedad de funciones celulares debido a que existen proteínas capaces de reconocer a este ion de forma específica. Los eventos celulares regulados por calcio incluyen funciones básicas como transcripción génica, metabolismo, proliferación y apoptosis. Entre los procesos celulares más avanzados que involucran calcio están la fertilización, migración, exocitosis y contracción muscular. La frase “señalización por Ca^{2+} ” puede referirse a señalización célula-célula, llamada señalización intercelular por Ca^{2+} , o a rutas de transducción de señales, llamadas “señalización de Ca^{2+} intracelular” (M.J. Berridge et al., 2003; Bootman et al., 2001; Clapham, 2007). Hay una gran variedad de proteínas que unen Ca^{2+} , entre estas están la Calmodulina (CaM, Calreticulina (CRT), Calnexina (CNX),) y Calcineurina (CLN), entre muchas otras.

Calreticulina

La Calreticulina es una proteína de 55 kDa con una secuencia señal escindible en el extremo N-terminal (Denning et al., 1997; Fliegel et al., 1989) y una señal de retención en RE dada por la secuencia de aminoácidos KDEL en el extremo C-terminal. Estas secuencias de aminoácidos son responsables de la localización y la retención de calreticulina en el lumen del RE. Dependiendo de la especie, calreticulina puede tener uno o más sitios de N-glicosilación potenciales. El patrón de glicosilación de la proteína parece ser heterogéneo y esto constituye una característica conservada de la proteína. El choque térmico puede desencadenar la glicosilación de calreticulina (Jethmalani et al. 1998; Jethmalani et al. 1994), sin embargo, la consecuencia funcional de esta glicosilación inducida por estrés de la proteína es aún poco conocida.

Calreticulina se ha implicado en una enorme cantidad de funciones celulares y cualquier cambio en su expresión y función tiene efectos profundos en muchas de ellas. Sin embargo, las dos funciones principales que Calreticulina realiza en el lumen del RE son: (i) su participación como chaperona y (ii) en la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} . La sobreexpresión de la proteína en una

variedad de sistemas celulares da lugar a una mayor cantidad de Ca^{2+} intracelular almacenado (Bastianutto et al., 1995).

Calmodulina

Calmodulina (CaM) una proteína citoplásmica cuya función es transducir un modesto aumento del calcio intracelular en modificaciones de la actividad de proteínas y por ende en una respuesta fisiológica en todas las células eucariotas. Existen una gran variedad de proteínas que son blanco del complejo Ca^{2+} -CaM, entre éstas estarían diferentes cinasas y fosfatasas, proteasas (calpaína), la sintasa de óxido nítrico, la bomba de extrusión de calcio de la membrana plasmática, diferentes canales iónicos, etc. La apocalmodulina es una proteína de 148 aminoácidos con cuatro dominios de unión a calcio y que tiene una forma característica de pesa manual en su estructura cristalina. La unión a calcio de los cuatro dominios en presencia de una proteína diana permite que la proteína actúe eficazmente. El alto contenido de metionina de dos parches superficiales hidrofóbicos en dos dominios de CaM crea una superficie de interacción flexible y plegable, que no es muy selectiva en la especificidad de la interacción. En consecuencia, el complejo calcio-CaM puede unir eficazmente a los dominios de unión a CaM de todas sus proteínas diana, a pesar de su falta de homología de secuencia de aminoácidos; su única característica común es que son péptidos hidrofóbicos básicos que tienen una propensión a formar una α -hélice (Vogel, 1994).

Calcio y virus

Se ha descrito que algunas proteínas virales son capaces de perturbar la homeostasis de Ca^{2+} intracelular por la modulación de bombas de Ca^{2+} y/o canales de la membrana plasmática como es el caso de Tat y gp120 del HIV-1 y HBx del HBV; también promueven la liberación de Ca^{2+} de los reservorios internos a través del IP3R, por ejemplo, NSP4 de rotavirus y Nef del HIV; o bien pueden afectar la permeabilidad de la membrana o alterar la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} como la proteína 2B del coxsakievirus, p7 del HCV, y la proteína del core del HCV (Zhou et al., 2009).

Las células huésped contienen abundantes proteínas de unión a Ca^{2+} (CaBP), por consiguiente, las proteínas virales utilizan un número importante de CaBP celulares, incluyendo proteínas en citoplasma (por ejemplo, anexina, calmodulina y S100), en retículo endoplasmático (por ejemplo, ERC-55, calreticulina y calnexina), y en la matriz extracelular (por ejemplo, fibulina-1) en su ciclo de replicación (Figura 1).

Proteínas dependientes de calcio y Dengue

Dada la austeridad de los genomas virales, se ha descrito que diversos virus emplean proteínas celulares para llevar a cabo un ciclo replicativo viral de manera eficiente. Específicamente, para los virus de RNA, se ha descrito la participación de proteínas celulares que llevan a cabo funciones como factores de traducción, proteínas del citoesqueleto y proteínas chaperonas (Lai, 1998). En este sentido, entre las proteínas residentes del RE que se unen a la región no traducida (RNT) 3' del RNA de DENV se encuentran las proteínas calreticulina (CRT) y proteína disulfuro isómerasa (PDI) (Yocupicio-Monroy et al., 2003). También se han descrito interacciones directas entre la proteína de la envoltura E de DENV y las proteínas de unión a inmunoglobulina (BiP), Calnexina y Calreticulina (Limjindaporn et al., 2009). Además de esto, resultados preliminares en nuestro laboratorio indican que hay variaciones en los niveles de calcio durante la infección por DENV observándose un aumento en la entrada capacitativa de calcio. La entrada capacitativa se llama así, por analogía con un capacitor en un circuito eléctrico y se caracteriza porque la entrada de calcio a la célula es regulada por el estado de llenado de los almacenes de calcio celulares. Así, los almacenes de calcio previenen la entrada cuando están llenos y promueven su entrada cuando el calcio empieza a salir (Berridge, 1995). Contrario a lo que se esperaba en las células infectadas con DENV, se encontró una disminución en los niveles de calcio en RE, fenómeno en el cual creemos que podrían estar involucradas proteínas dependientes de calcio ya que su papel en la regulación de los niveles de calcio ha sido demostrado. Otra posibilidad para explicar la reducción de calcio en el RE está relacionada con la ATPasa SERCA que es la

encargada de restaurar los niveles de calcio en el RE transportándolo activamente a través de la membrana de RE. Es posible que durante la infección por DENV su expresión pudiera estar afectada, alterando así el modo en que el retículo puede mantener sus niveles de calcio. Dado que SERCA2b es una molécula ubicua y está presente en distintos tipos celulares y considerando la habilidad de DENV para infectar diversas células, es posible que tuviera algún efecto específico sobre esta molécula (Periasamy et al. 2007; Hovnanian 2008).

Cellular CaBP	Viral molecular identity	Virus	Consequences of interaction
Annexin II	p55 ^{GAG}	HIV-1	Facilitates virus entry and fusion in macrophages
	Glycoprotein B	CMV	Enhances binding and fusion to membranes
Annexin V	Small HBsAg	HBV	Participates in initial steps of HBV infection
Calmodulin	Nef	HIV-1	Alters T lymphocyte signaling pathway
	gp 160/gp41	HIV-1	Disrupts CaM signaling pathway
	gp 41	SIV	
	p17 ^{GAG}	HIV-1	
Calreticulin/calnexin	E1 and E2	RUB	Regulates viral glycoprotein maturation
	Viral RNA	RUB	
	MP	TMV	Regulates cell-to-cell virus movement
	F, HN	SeV	Mediates maturation of glycoproteins
	gp160	HIV-1	Facilitates protein maturation
	P12 ^I	HTLV-1	
	Tax	HTLV-1	Facilitates viral protein folding; possibly mediates the interaction with MHCII
ERC-55	E6	HPV	
Fibulin-1	E6	HPV	Regulates cell migration and invasion
S100A10 (p11)	pol	HBV	Inhibits viral replication
	NS3	BTV	Mediates nonlytic virus release

Abbreviations: HIV, human immunodeficiency virus; CMV, cytomegalovirus; HBV, hepatitis B virus; SIV, simian immunodeficiency virus; RUB, rubella virus; SeV, tobacco mosaic virus; HTLV, human T-cell lymphotropic virus; HPV, human papillomavirus; EBV, Epstein-Barr virus; BTV, bluetongue virus.

Fig.1 Interacciones entre proteínas de unión a calcio celulares y virus (Zhou et al., 2009)

Justificación.

- La Calmodulina y Calreticulina actúan como moduladores en infecciones virales
- La Calreticulina interacciona con proteínas de virus con genoma de RNA y con el genoma de DENV.
- El determinar la participación de estas proteínas en la infección por DENV y evaluar posibles mecanismos a través de los cuales modulan la infección nos ayudará a comprender mejor el ciclo replicativo de DENV.

Hipótesis

Las proteínas celulares Calreticulina y Calmodulina participan en el ciclo replicativo del DENV mediante interacciones con proteínas virales y/o interfiriendo la respuesta celular a IFN

Objetivo general

Determinar la participación de las proteínas CRT y CaM durante la infección por DENV.

Objetivos Particulares

1. Caracterizar la participación de CaM y CRT durante la infección por DENV.
 - a) Determinar la localización Subcelular de CaM y CRT en células infectadas
 - b) Determinar el Efecto de la inhibición de CaM y CRT sobre la infección con DENV
2. Estudiar las vías involucradas en la modulación de la infección por CaM y CRT.
 - a) Determinar la posible interacción de CaM y Proteínas virales
 - b) Evaluar la respuesta a IFN durante la infección con DENV debida a la modulación de CRT.

Metodología

Células y virus

Se cultivaron la línea celular de hepatocarcinoma humano Huh7 (gentilmente donada por La Dr. Rivas de la Universidad Autónoma de Nuevo León) y células Vero (células de riñón de mono verde) ATCC N° CCL-81) en DMEM advanced suplementado con glutamina 2 mM, Penicilina (5×10^4 U/ml) -estreptomicina (50 µg/ml), 5% de suero fetal de bovino (SFB) y 1 ml/l de anfotericina B (Fungizona) a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. La línea celular derivada de Vero, transfectada establemente con el replicón de DENV4 acoplado a luciferasa se cultivó en DMEM Advanced suplementado con G418 (Geneticin) como agente selectivo. La propagación de DENV, serotipo 4 cepa H241 y serotipo 2 cepa Nueva Guinea, se llevó a cabo en cerebro de ratones lactantes CD1 (proporcionada por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL)). Los títulos virales se determinaron mediante ensayos de placa en células BHK-21 (Derivadas de riñón de Hamster) (amablemente donadas por el Instituto Pedro Kouri, Cuba).

Infección de células Huh7 y Tratamientos

Las células Huh7 se cultivaron en placas de 12 pozos hasta un 90% de confluencia, después se lavaron y se infectaron con DENV2 o con DENV4 a una multiplicidad de infección (MOI) de 3 en medio con suero al 1% durante 2 horas a 37°C. Después de la infección, las células se lavaron una vez con glicina (pH 3) para inactivar el virus no internalizado y 3 veces con PBS. A continuación, las células se trataron con diferentes concentraciones de W7 (hidrocloruro de 7 (N- (6-aminohexil) -5-cloro-1-naftalenosulfonamida, Sigma 61714-27-0), W5 (N- (6-Aminohexil) (2,4 - diclorofenil) - 2- (2,4 - diclorobenciloxi) - 3 - [(4 - clorofenil) metil] Etil] -1H-imidazolío, Sigma 57265-65-3) a 10 µM y calmidazolium en DMSO en medio completo durante 48 horas a 37°C. Todos los experimentos se realizaron siguiendo el mismo protocolo de infección y el esquema de tratamiento con fármaco.

Pruebas de viabilidad Celular

Para las pruebas de viabilidad celular se utilizó SYTOX® Green, el cual es un componente que se intercala en el ADN de las células muertas pero se excluye de las células vivas. Las células se cultivaron en placas de 24 pozos y se trataron con W7 por 48 horas. Posteriormente, se incubaron con 1 μ M de SYTOX® Green durante 10 minutos. Los resultados se analizaron por microscopía de fluorescencia y se expresaron como unidades relativas de fluorescencia. Como control se utilizó mitomicina, un fármaco que induce reducción de la proliferación celular.

Pruebas de proliferación Celular

10 millones de células fueron tripsinizadas, lavadas una vez con PBS y resuspendidas en PBS. Se añadieron 1,5 μ l de solución CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein) 5 μ M a 1 ml de suspensión celular y se incubaron a 37°C durante 20 minutos. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 1 ml de medio y se sembraron en placas de 12 pozos. Venticuatro horas después, las células fueron tratadas con W7 por 48 horas. Dado que la CFSE se escinde por esterasas intracelulares para formar el compuesto fluorescente, la detección del número de divisiones celulares se puede analizar por citometría de flujo, de este modo a mayor número de divisiones celulares menor cantidad de fluorescencia. Las células no marcadas se incluyeron en todos los experimentos y se utilizaron para establecer las compensaciones en el citómetro de flujo. Los resultados se expresaron como recuento de células.

Obtención de extractos proteicos totales

Después del periodo de incubación de 48 horas, se obtuvieron extractos de proteína total, mediante lisis celular por un buffer que contiene Tris HCl pH=8, NaCl, Glicerol y Tritón X-100 con inhibidor de proteasas COMPLETE (ROCHE). Los extractos se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los geles para SDS-PAGE, se prepararon en gradiente con concentraciones de 5 al 20% de acrilamida/bisacrilamida. Los geles se corrieron en cámaras de electroforesis BioRad para proteínas a un voltaje constante de 60 volts por 90 minutos.

Western-blot

Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando un aparato de transferencia semi-seca (BioRad) a 18 volts por 45 minutos con amortiguador de transferencia (0.025M Tris base, 0.019 M glicina, 20% V/V metanol). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 10% por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche con anticuerpos anti-calreticulina, anti-calmodulina (SantaCruz Biotechnology) según el caso, diluidos 1:1000. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-actina 1:3000 (gentilmente donado por el Dr. M. Hernández, CINVESTAV). Las proteínas virales fueron marcadas con anticuerpos contra la proteína de la Envoltura (E) y contra NS3 de la marca Genetex. Como anticuerpos secundarios se usaron anti-ratón (1:15000) para actina y E, anti-conejo (1:7500) para calmodulina y NS3 y anti-chivo (1:30000) (SantaCruz biotechnology) para calreticulina todos acoplados a peroxidasa. Los segundos anticuerpos se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente y la reacción se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit "Supersignal West Femto Maximun Sensitivity Substrate (Pierce).

Análisis densitométrico

Las bandas obtenidas en los ensayos de Western-blot se sometieron a análisis densitométrico utilizando el software ImageJ, el cual genera un histograma en base a la intensidad de la banda y en base al área bajo la curva se calcula el porcentaje de expresión de la proteína con respecto al control.

Extracción de RNA

El RNA total de las células no infectadas e infectadas se extrajo utilizando Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El RNA se resuspendió en agua con DEPC como inhibidor de RNAsas y se almaceno a -70°C hasta su uso.

Tratamiento con DNAsa

Se tomaron 10 µg de RNA total y se trataron con 2 unidades de DNAsa (New England BioLabs) en un volumen final de 15 µl incubando a 37°C por 10 minutos. La DNAsa se inactivó con EDTA 5µM a 70°C por 10 minutos. El RNA tratado se almacenó a -70°C.

Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando la enzima Improm II (Promega) ajustando el protocolo para un volumen final de 10 µl utilizando OligodT 1µM como cebador.

PCR tiempo real

Para amplificar el fragmento de interés del genoma viral, que corresponde a un fragmento de 151-pb del gen de la cápside de DENV, se realizó una RT-PCR convencional de RNA aislado de células infectadas con DENV utilizando los siguientes cebadores: DV2C-L 5'- CAA TAT GCT GAA ACG CGA GA-3 ' y DV2C-R: 5'-TGC TGT TGG TGG GAT TGT TA-3' para DENV2 y 152-pb para DENV4 usando los siguientes cebadores D4F 5'-GAGCCGGAAAGACAAAAAGA-3 ' y D4R 5'-ACAGCTGGGGTCTGATAACG-3'. Estos productos se clonaron en un sistema Vector pJet1.2 (Thermo Scientific), y el plásmido recombinante se purificó y cuantificó por espectrofotometría a $\lambda = 260$ nm. Se preparó una dilución que contenía 10^{10} copias de plásmido/µl de acuerdo con la fórmula:

$$No. \text{ Copies} = \frac{6 \times 10^{23} \text{ copies/mol} \times \text{concentration [g/}\mu\text{l]}}{\text{plasmid molecular weight}} + \text{insert [g/}\mu\text{l]}$$

Se prepararon diluciones en serie del plásmido (10^9 - 10^2 copias/µl) y se generó una curva estándar (Prada - Arismendy y Castellanos, 2011).

El cDNA se obtuvo por transcripción reversa utilizando 1 µg de RNA total de cada condición experimental, se añadieron cebadores aleatorios (Promega) de 0,025 µg µl y se añadió la enzima ImpromII (Promega) durante 1 ciclo de amplificación en las siguientes condiciones: 25 ° C durante 5 min, 42 ° C durante 60 min y 70 ° C durante 15 min (Veriti Thermal Cyler, Applied Biosystems). La amplificación por PCR en tiempo real se realizó mediante SYBR Fast universal (Kapa) en un aparato Eco Illumina System utilizando una mezcla de reacción que contenía 1 µl de cDNA y 5 µl de 2X Master Mix bajo las siguientes condiciones: 2 min a 50 ° C, 2 Min a 95 ° C, 40 ciclos de 5 segundos a 95 ° C y 30 segundos a 55 ° C. Para confirmar la ausencia de dímeros de cebadores, se realizó una curva de disociación calentando productos desde 55°C a 95°C.

Determinación de localización subcelular y porcentaje de infección mediante Microscopía confocal y Citometría de flujo

Las células Huh-7 sembradas sobre cubreobjetos redondos en placa de 24 pozos infectadas y tratadas como se indicó antes se analizaron mediante microscopía confocal y citometría de flujo para determinar la distribución de proteínas virales y el porcentaje de células infectadas, respectivamente. Las laminillas o células en suspensión se fijaron con formaldehído al 1%, se permeabilizaron durante 20 min (1X PBS, 0,1% de saponina y 1% de FBS) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente (RT) con anticuerpo policlonal anti-NS3 de conejo (GENETEX), anticuerpo monoclonal anti-E de ratón (4G2), con el anticuerpo anti-CaM de conejo y anti-Calreticulina (Santa Cruz Biotechnologies). Como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-ratón Alexa 488 de burro y Alexa 555 de burro anti-conejo (Life Technology) y los núcleos se contra-tiñeron con Hoechst 33342. Se observaron en un microscopio confocal de láser Zeiss LSM700 y se analizaron las imágenes utilizando el software ZEN 2010. La citometría de flujo se realizó en un BD LSR Fortessa y los datos se analizaron con el software FlowJo v.

Determinación de la Progenie viral y secreción de NS1

Los sobrenadantes de células infectadas no tratadas y tratadas se analizaron para determinar la progenie viral mediante ensayos de unidades formadoras de focos. Para ello, se inocularon monocapas confluentes de células Vero cultivadas en placas de 96 pozos con diluciones seriales base 10 de sobrenadante de células infectadas con DENV (volumen final 50 µl) durante 1 hora a 37°C para permitir la adsorción viral. A continuación, se retiró el inóculo. Las monocapas de células se lavaron una vez con Medio Hank's y se añadieron 0,1 ml de medio completo. El medio se retiró a las 48 hpi y las células se fijaron con formaldehído al 1%, se permeabilizaron durante 20 min, se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-E 4G2 durante 2 h a RT y más tarde con anticuerpo secundario anti-FITC de ratón. Los focos se observaron mediante microscopía de fluorescencia y se expresaron como unidades de formación de focos (FFU)/ml. Se midió la secreción de NS1 en los sobrenadantes de células infectadas usando un ELISA comercial (Platelia, Biorad).

Actividad de Luciferasa

La actividad luciferasa de células Vero tratadas con W7 que expresa un replicón de DENV4 se midió como se indica en el protocolo de kit (sistema de ensayo de luciferasa Renilla, Promega) como se describió anteriormente (Alcaraz-Estrada et al., 2010).

Identificación del sitio de unión Putativo de CaM a NS2A

El sitio de unión putativo de CaM a NS2A fue predicho por **CaM target database** (http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/pub_pages/search/index.htm) utilizando la secuencia de la proteína NS2A de DENV (AFX68868.1). El resultado se muestra con un valor numérico donde 9 significa una posición altamente significativa.

Docking

Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD) se utilizó para la predicción del estudio de la interacción proteína-ligando (Thomsen y Christensen, 2006).

NS2A construcción, expresión y purificación de la proteína recombinante

Se llevó a cabo una RT-PCR de células Huh-7 infectadas con DENV4 cepa H241 utilizando los oligonucleótidos sentido 5' TTACCTCGAGATGTTAGG GGACACCATGTCTGG con XhoI como sitio de restricción, y 5' TACTAAGCTTTCTCTTTGAAGCTCCTTTCATGA con HindIII como sitio de restricción. La secuencia completa de NS2A se clonó en el vector pPROEX HTa (Invitrogen) para expresión bacteriana. Este vector contiene una etiqueta His-6X en el extremo N-terminal para la purificación por afinidad de la proteína expresada. La proteína NS2A marcada con His-6X se expresó por inducción de IPTG durante toda la noche a 39°C. La purificación de la proteína His-tag rNS2A se llevó a cabo por cromatografía de afinidad utilizando la resina de afinidad TALON (CLONTECH).

Cromatografía de afinidad de NS2A

Se pre-aclararon un total de 2 mg/ml de extractos celulares por incubación con 200 µl de resina TALON (en ausencia de la rNS2A) previamente equilibrada con amortiguador de lisis durante 4 h en agitación lenta. Posteriormente, los extractos se recuperaron por centrifugación a 3000 rpm durante 3 min a 4°C. A continuación, se incubaron 500 µl de resina acoplada a la rNS2A o 500 µl de la resina de control con extractos celulares pre-aclarados diluidos en 5 volúmenes de amortiguador de interacción (Tris base 20 mM, NaCl 200 mM y imidazol 20 mM), 48 horas a 4 ° C con agitación suave. Las resinas se recuperaron por centrifugación y se sometieron a 8 lavados con 5 volúmenes de amortiguador de lavado que contenía concentraciones crecientes de imidazol y NaCl en buffer A. Finalmente, las proteínas unidas a rNS2A se examinaron mediante Western blot.

Precipitación de proteínas de sobrenadante.

Se añadió 1/4 de volumen cloroformo y 1 volumen de metanol al medio cosechado, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Se aspiró la capa de metanol y se añadió de nuevo 1 volumen de metanol centrifugando

nuevamente a 12000 rpm durante 5 minutos. La pastilla se dejó secar durante 5 min.

Resultados

W7 inhibe la infección por DENV.

Dada la importancia de iones Ca^{2+} en la función del retículo endoplásmico, que participan en la formación de complejos replicativos DENV y que CaM es una proteína multifuncional en la fisiología celular, se analizó el papel de la CaM durante la infección por DENV. Inicialmente, la expresión y distribución de la CaM en las células infectadas se evaluó mediante Western blot y microscopía confocal en células infectadas y cosechadas 48 hpi. La distribución de la CaM no se modificó en las células infectadas en comparación con las células no infectadas (Figura 2B); y tampoco se observó cambio en la cantidad de proteína (Figura 2A).

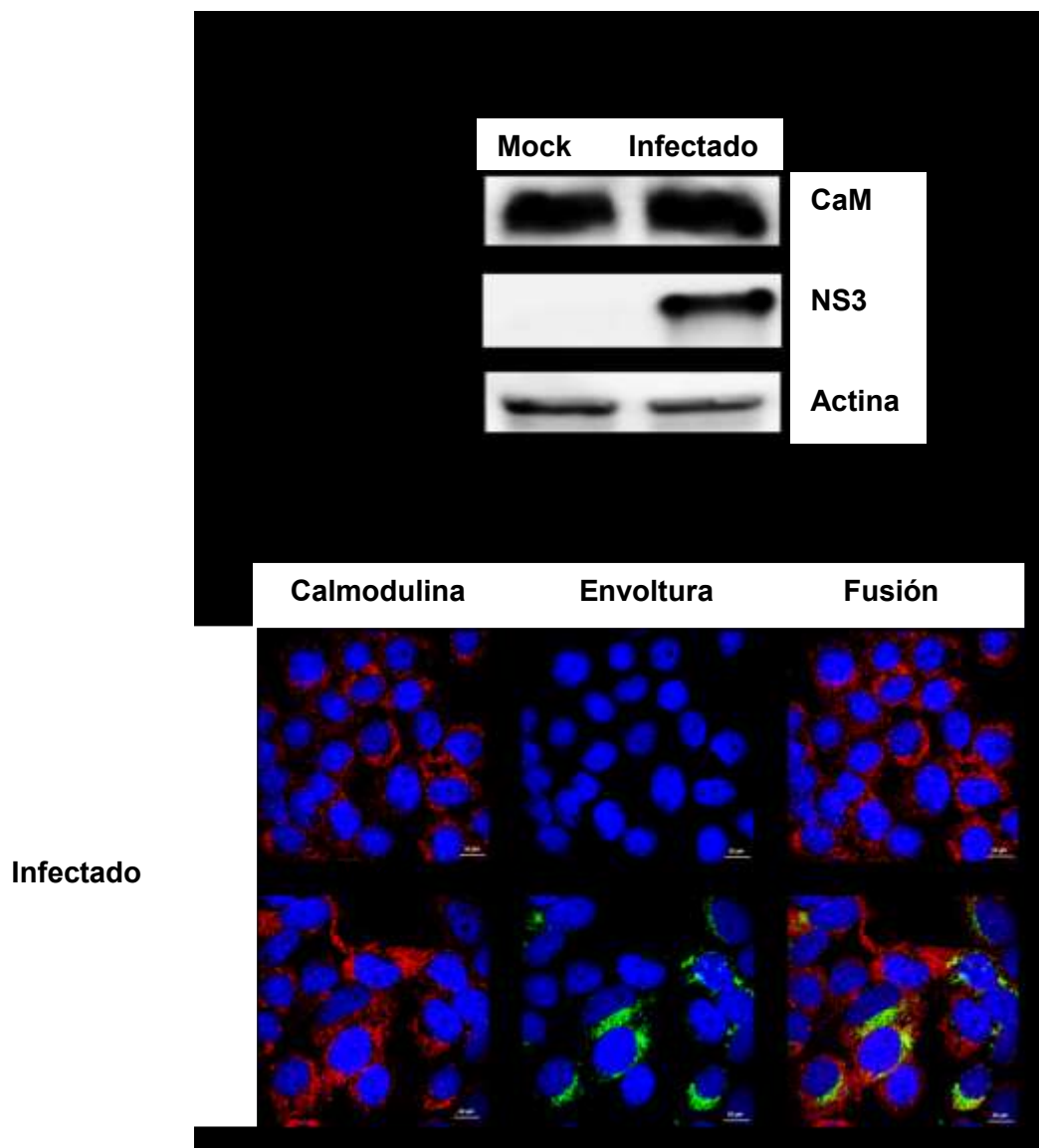


Fig.2 Niveles de expresión y localización subcelular de CaM en células infectadas con DENV. (A) Se analizaron extractos totales de células Huh-7 Mock (M) no infectadas o infectadas con DENV durante 48 horas mediante ensayo Western-blot usando anticuerpos anti-CaM. Se utilizó anticuerpo anti-actina como control de carga y se utilizó anti-NS3 como control de la infección. Se muestra un ensayo de Western blot representativo. (B) células Huh-7 no infectadas (Mock) o infectadas con DENV2 durante 24 horas fueron fijadas y teñidas con anticuerpos anti-CaM (rojo) y anti-E (verde). Los núcleos se contrastaron con Hoechst (azul). La ubicación de las proteínas se analizó mediante microscopía confocal. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

El siguiente paso fue determinar si la CaM podría estar jugando un papel durante la infección. Para analizar esta posibilidad, las células infectadas fueron tratadas con el antagonista de CaM W7. Inicialmente, se evaluó la viabilidad Huh-7 después del tratamiento con 10, 25 y 50 M de W7 durante 48 hrs. Aunque la concentración de 10 y 25 mM de W7 no indujo ningún efecto letal en las células, el tratamiento con 50 mM de W7 causó una reducción significativa en la viabilidad celular (85%) (Figura 3).

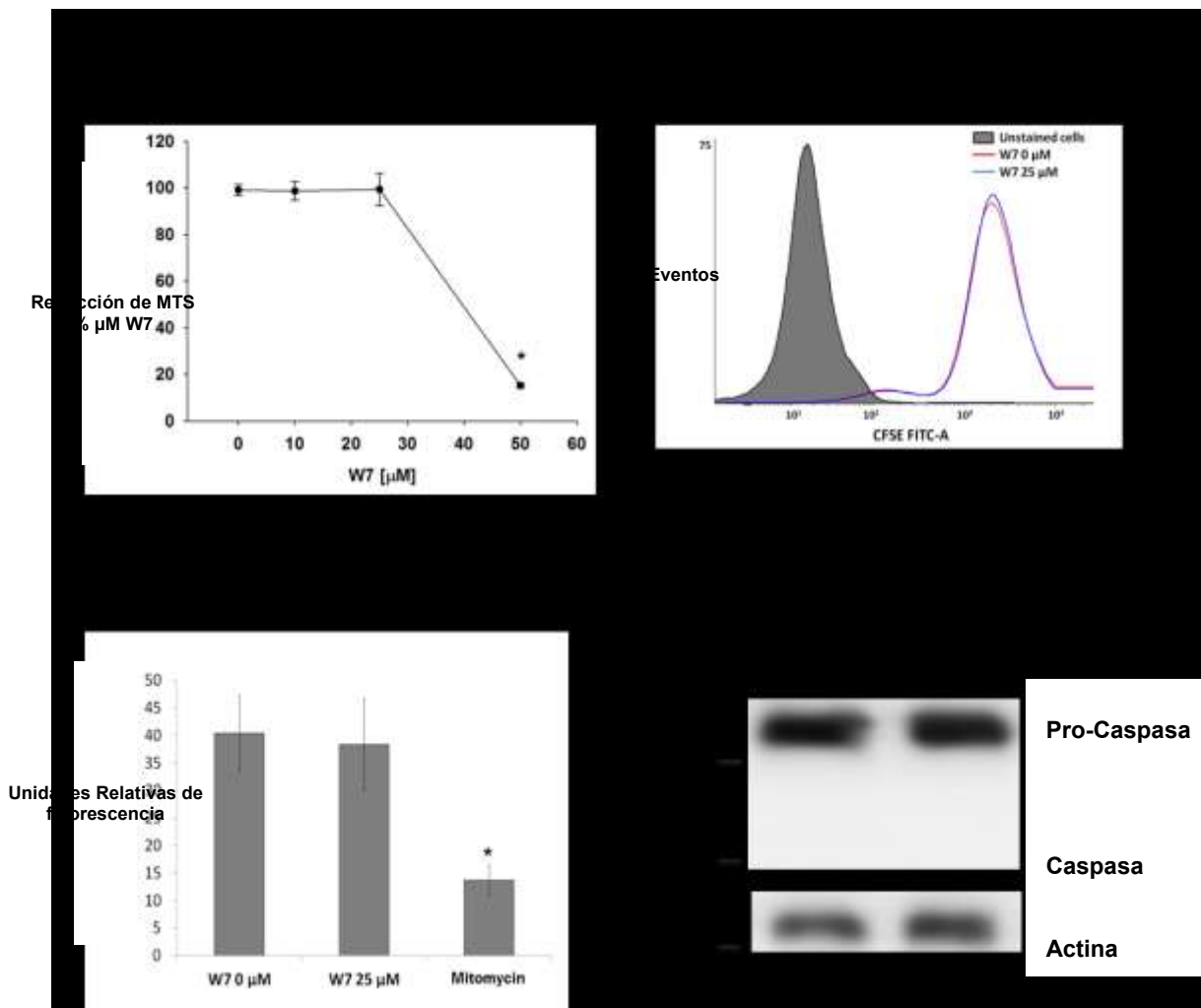


Fig.3 Viabilidad y proliferación de células tratadas con W7. (A) Se analizó la viabilidad de las células tratadas con W7 (10, 25 y 50 μM) o vehículo (0 μM) mediante reducción de MTT. La viabilidad celular se expresa como media de la absorbancia normalizada \pm SEM de tres experimentos independientes. $P < 0,05$. **(B)** Las células se trataron con vehículo o con W7 (25 μM) por 48 horas. Dado que CFSE es escindido por esterasas intracelulares para formar el compuesto fluorescente, la detección del número de divisiones celulares se realizó por citometría de flujo. Las células no teñidas se incluyeron en todos los experimentos y se utilizaron para establecer las compensaciones en el citómetro de flujo. La imagen es representativa de tres experimentos independientes. **(C)** Las células tratadas con vehículo o con W7 (25 μM) a las 48 horas se incubaron con 1 μM de SYTOX® Green. Los resultados se expresaron como unidades relativas de fluorescencia. Mitomicina se utilizó como un

control positivo de la reducción de la proliferación celular. La proliferación celular se expresa como media de unidades relativas de fluorescencia \pm SEM de tres experimentos independientes. $P < 0,05$. (D) Se analizaron extractos de células totales de células Huh-7 Mock (M) infectadas o infectadas con DENV durante 48 horas mediante ensayo Western-blot utilizando anticuerpos anti-pro-caspasa. Se utilizó un anticuerpo anti-actina como control de carga. Se muestra un ensayo de Western blot representativo.

Para analizar el efecto de W7 en la infección por DENV, las células Huh-7 se infectaron a una MOI de 3 por 2 horas y a continuación las células fueron tratadas con 25 μ M de W7 durante 48 hrs. Curiosamente, el tratamiento con W7 causó una disminución en la cantidad de células infectadas en comparación con las células no tratadas analizadas por microscopía confocal. Esta reducción en la cantidad de células infectadas se confirmó por citometría de flujo (56% vs 33%) (Figura 4A y 4B).

En concordancia con la reducción en la cantidad de las células infectadas, una reducción significativa en la progenie viral, expresada como FFU/ml, también se observó en las células tratadas con W7 e infectadas con DENV2 y DENV4 en comparación con las células no tratadas (Figura 4C); por otro lado se trató a las células con otros dos inhibidores de Calmodulina, W5 y Calmidazolium para confirmar el efecto de la inhibición de esta proteína sobre la progenie viral (Figura 4D).

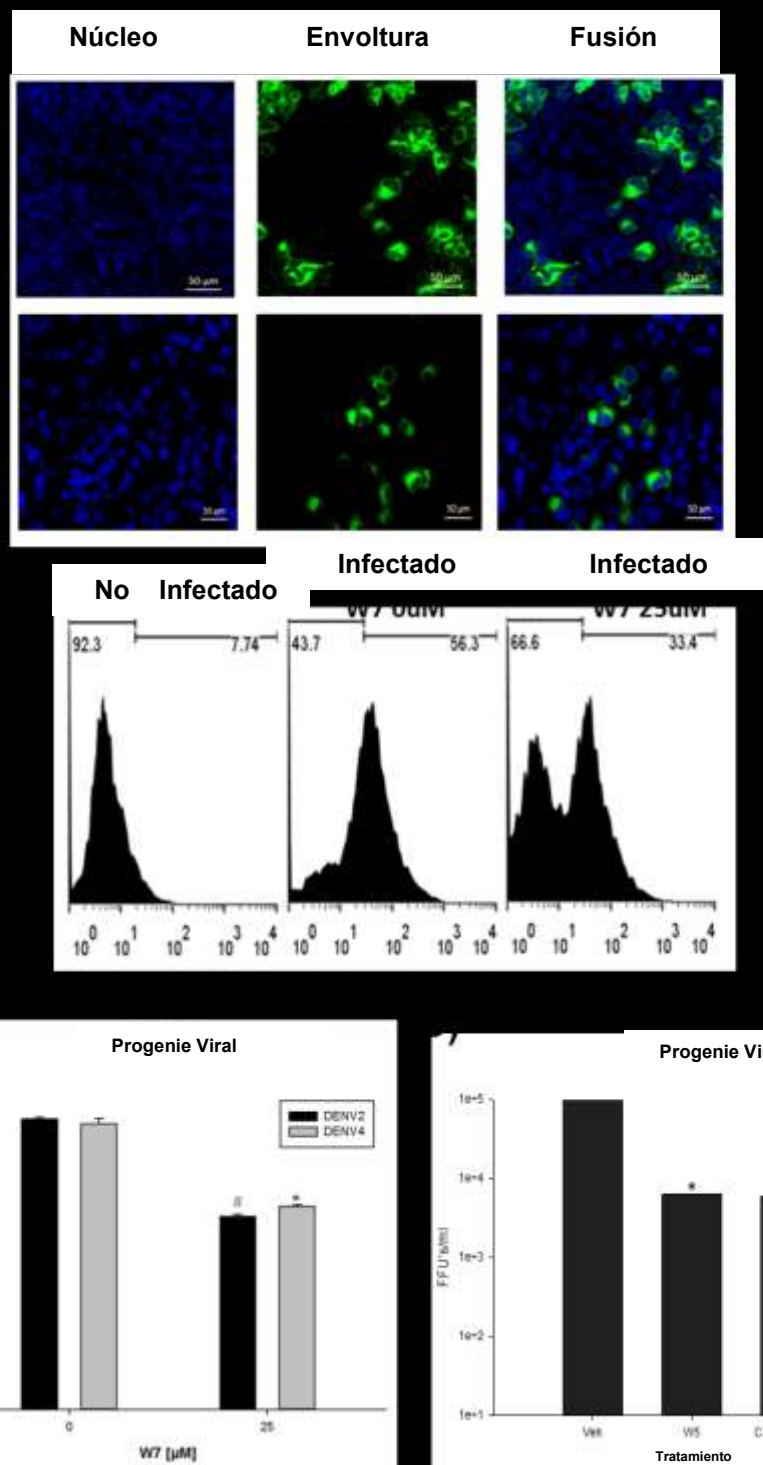


Fig.4 Efecto de W7 en la infección por DENV. Se trataron células Huh-7 infectadas con DENV2 a una MOI de 3 con 25 µM de W7 o vehículo (0 µM), y la cantidad de células infectadas se analizó a las 48 post- infección mediante microscopía confocal (A) y citometría de flujo (B). Para la microscopía confocal y la citometría de flujo las células fueron fijadas y teñidas para E (verde), Los núcleos se contrastaron con Hoescht (Azul). (C) Se analizaron sobrenadantes de células Huh-7 infectadas con DENV2 y DENV4 tratados con vehículo (0 µM) o con W7 (25 µM) durante 48 horas mediante un ensayo de unidades formadoras de focos (UFF). La progenie viral se

expresa como la media \pm SEM de UFF/ml de tres experimentos independientes. $P < 0,05$. (D) Se analizaron sobrenadantes de células Huh-7 infectadas con DENV2 tratadas con vehículo (0 μ M) o con W5 (25 μ M) o calmidazolium (10 μ M) durante 48 horas mediante unidades formadoras de focos. La progenie viral se expresa como la media \pm SEM de FFU/ml de tres experimentos independientes. $p < 0,05$.

Para analizar adicionalmente el efecto de W7 en el ciclo de replicación de DENV, se evaluaron la síntesis de proteína viral y la replicación del RNA. Se observó una reducción significativa en los niveles de secreción de NS1 en células infectadas con DENV2 y DENV4 y tratadas con W7 en comparación con las células no tratadas (reducción de 58 y 68%, respectivamente) (Figura 5A). Esta inhibición de la secreción de NS1 correlaciona con una reducción significativa en la cantidad de la proteína no estructural 3 (NS3) y en la proteína de la envoltura evaluadas por ensayos de Western blot en células infectadas con DENV2 y DENV4 y tratados con W7 en comparación con las células no tratadas (64 y 60%, respectivamente) (Figura 5B y 5D). La reducción de la síntesis de proteínas está en concordancia con una reducción significativa en la síntesis de RNA viral (hasta un log en el número de copias del genoma) medida por qRT-PCR en células infectadas con DENV2 y DENV4 y tratadas con W7, en comparación con las células no tratadas (Figura 5C).

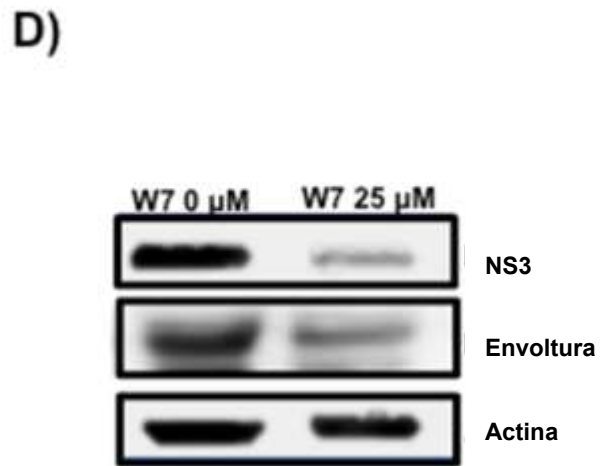
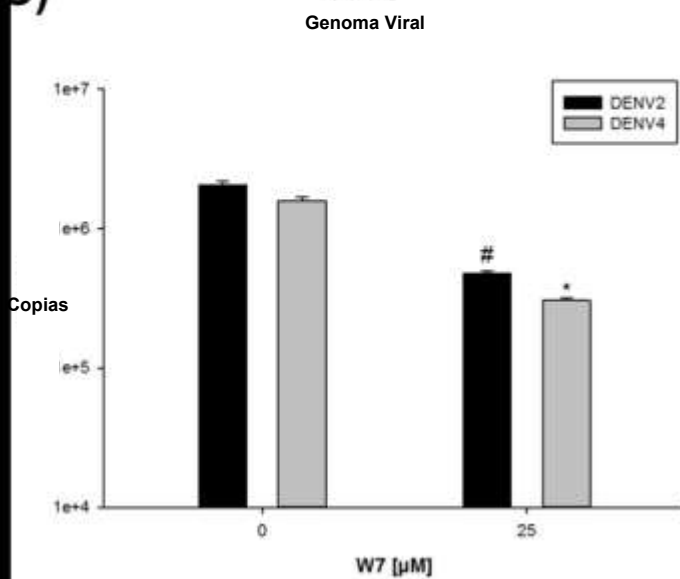
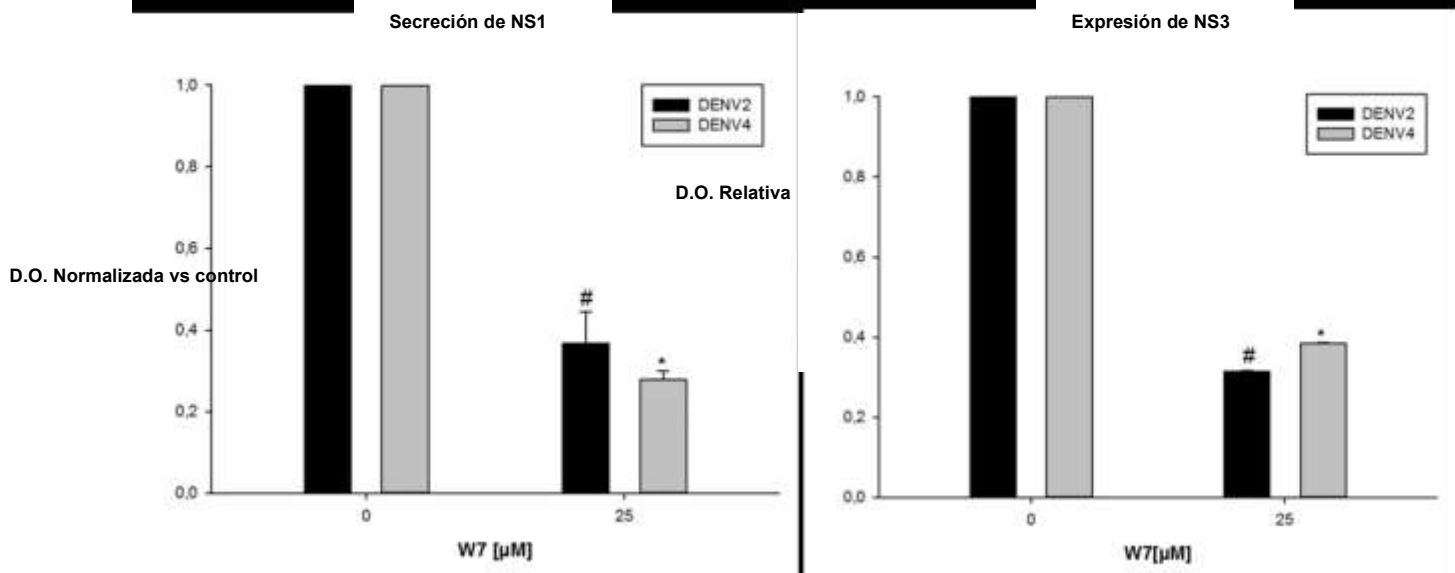


Fig.5 Efecto de W7 en la síntesis proteína y de RNA de DENV. Se trataron células Huh-7 infectadas con DENV2 (negro) o con DENV4 (gris) a una MOI de 3 con 25 μM de W7 o vehículo (0 μM) y se evaluó la secreción NS1 mediante ELISA (A). La secreción NS1 se expresa como media de la absorbancia normalizada ± SEM de tres experimentos independientes. P <0,05. Los niveles de expresión de NS3 y E (B y D) y genoma viral (C) se analizaron mediante Western blot y qRT-PCR (48 horas de

tratamiento), respectivamente. La cantidad de proteína NS3 se expresa como el valor de cambio de veces \pm SEM obtenido del análisis densitométrico de tres ensayos independientes. El genoma viral se expresa como media \pm SEM del número de copias de tres experimentos independientes. $P < 0,05$.

Para confirmar los datos obtenidos con las infecciones con DENV2 y DENV4, se utilizaron células VERO 4R, transfectadas establemente con el replicón de DENV4 se trataron con diferentes concentraciones de W7 y se evaluó la actividad de luciferasa. Como se observó con las células Huh-7, la viabilidad de las células Vero 4R no se redujo significativamente después de 48 horas de tratamiento con 10 y 25 μM de W7. Sin embargo, se observó una reducción del 80% en la viabilidad celular a la concentración de 50 μM de W7 (Figura 6A). Por lo tanto, se utilizó la concentración de 25 μM de W7 en experimentos posteriores. Bajo esas condiciones, se encontró una reducción de la actividad de luciferasa expresada como unidades relativas de luz en las células tratadas con W7 en comparación con las células no tratadas (Figura 6B). Estos resultados sugieren fuertemente que la CaM tiene un papel crucial en la traducción / replicación de DENV.

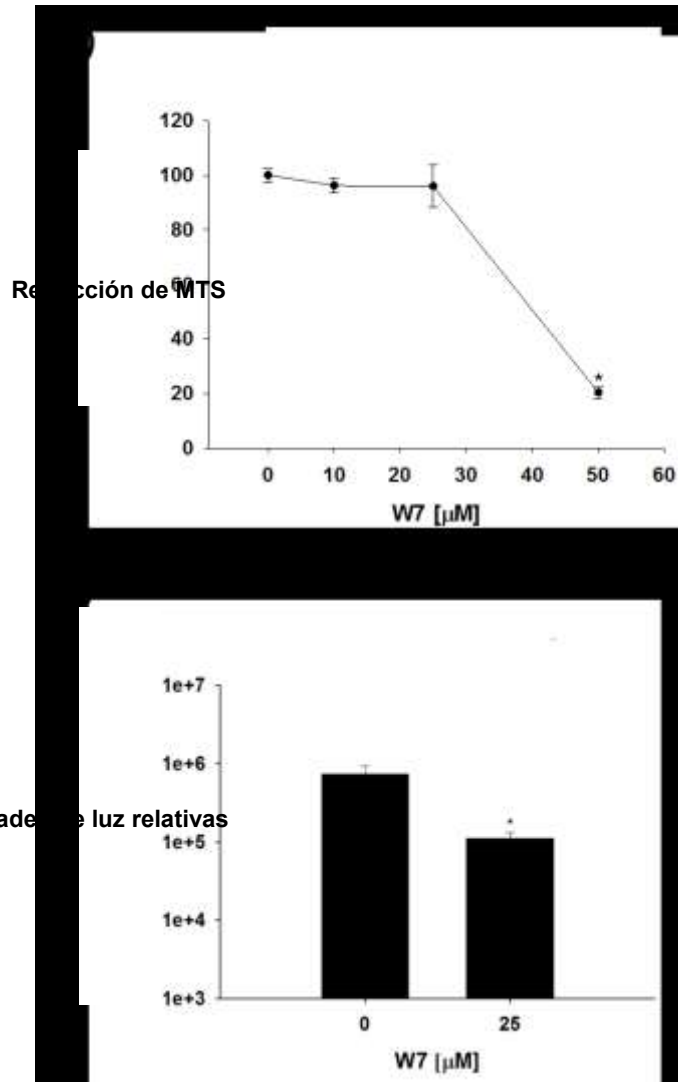


Fig.6 Efecto de W7 en la replicación del genoma viral. Las células Vero que expresan el replicón DENV 4 que codifica el gen de la luciferasa se trataron con W7 (10, 25 y 50 μM) o vehículo (0 μM) durante 48 horas y se analizaron para determinar la viabilidad celular mediante reducción de MTT (A) y la actividad luciferasa (B). La viabilidad celular se expresa como la media de absorbancia normalizada ± SEM. La actividad luciferasa se expresa como unidades relativas de luz (URL) y los datos mostrados son la media ± SEM de tres experimentos independientes.

W7 inhibe la formación de complejos de replicación.

Dado que el tratamiento con W7 indujo una inhibición de la traducción y/o replicación y ambos procesos se producen en el retículo endoplasmático, se evaluó el efecto del tratamiento con W7 en la formación de complejos de replicación por microscopía confocal. La distribución de dos proteínas virales, E y NS3, se utilizó para evaluar la integridad de los complejos replicativos. La primera observación fue que, aunque la cantidad de E y NS3 se reduce en las células tratadas con W7, los niveles de expresión de la proteína E no fueron tan fuertemente inhibidos como los de NS3 en comparación con las células no tratadas (Figura 7A). Este resultado sugiere que la expresión de NS3 es más susceptible a ser inhibida por W7 que la expresión de E. La segunda observación es que, en ausencia de W7 se observa una fuerte colocalización entre NS3 y E en las células infectadas; sin embargo, esta colocalización se reduce significativamente en las células tratadas con W7 (Figura 7B), sugiriendo que la CaM está jugando un papel importante en la formación de los complejos replicativos de DENV. Por otro lado para descartar que el efecto sobre los complejos replicativos se debiera a una alteración de citoesqueleto que pudiera tener una relación con la presencia de vimentina, se hizo un marcaje de ésta molécula y se analizó por microscopía confocal. Así, observamos que no se altera la distribución de vimentina en las células tratadas con W7 (Figura 7C), lo que nos indica que el efecto observado no se debe a una alteración del citoesqueleto como consecuencia del tratamiento con W7.

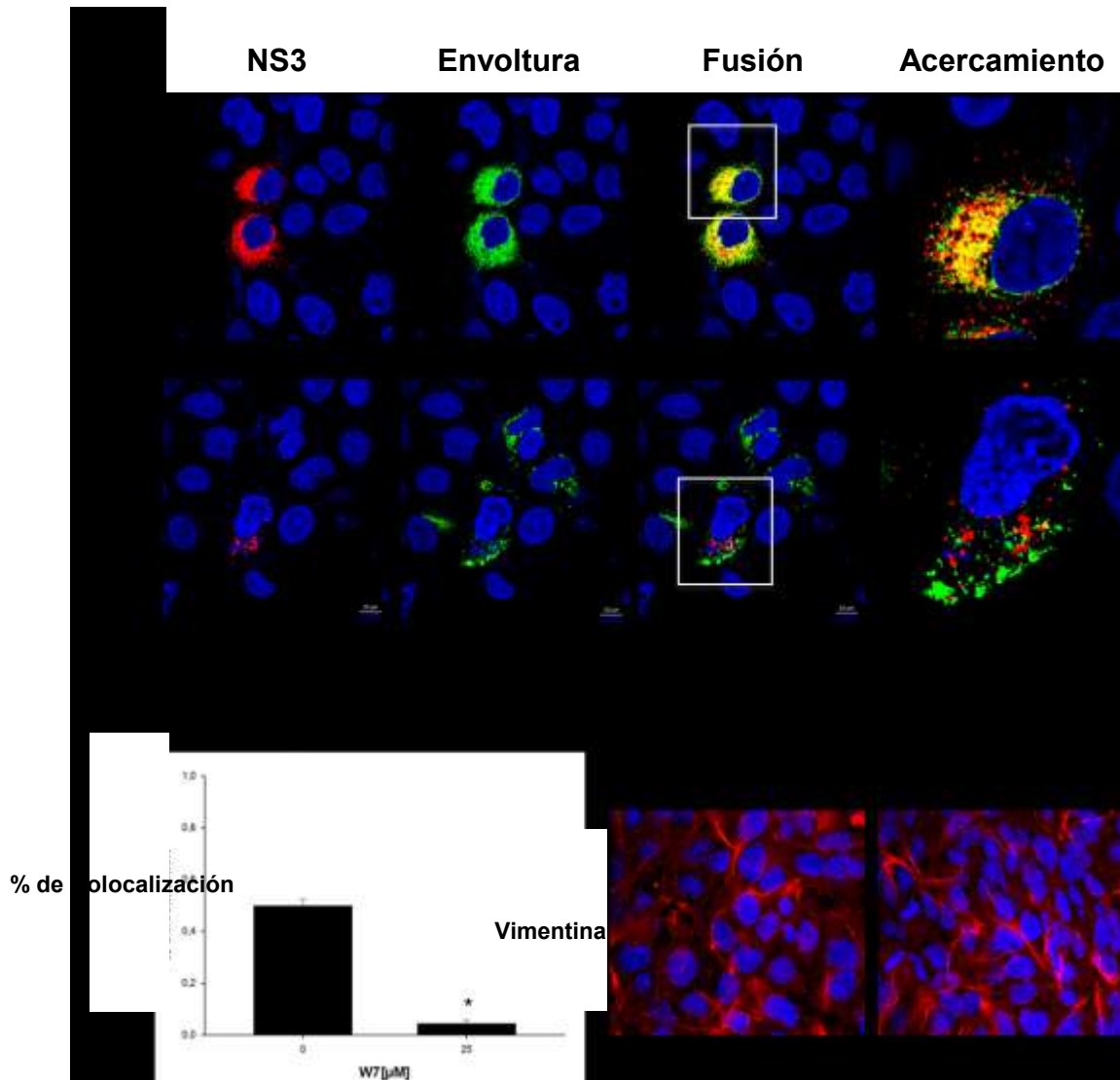


Fig.7 Efecto de W7 en el patrón de distribución de proteínas virales. Se infectaron células Huh-7 con DENV 4 y se trataron con vehículo o 25 μM de W7. Después de 48 horas de tratamiento, las células se fijaron y se tiñeron contra la proteína NS3 (rojo) y E (verde). Los núcleos se contrastaron con Hoescht (azul). (A) El patrón de distribución de las proteínas virales se analizó mediante microscopía confocal. El área seleccionada (caja blanca), ampliada 2.5X está mostrando una alteración en la localización de las proteínas virales. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. (B) El gráfico de la columna compara el coeficiente de colocalización \pm SEM entre ambas proteínas virales (proteína E / proteína NS3) de células infectadas no tratadas y tratadas con W7. $P < 0,05$. (C) Se infectaron células Huh-7 con DENV 4 y se trataron con vehículo o 25 μM de W7. Después de 48 horas de tratamiento, las células se fijaron y se tiñeron para vimentina (rojo). Los núcleos

se contrastaron con Hoescht (azul). El patrón de distribución de vimentina se analizó mediante microscopía confocal.

W7 mostró un sitio de interacción putativa con la proteasa de DENV.

Una posible explicación de los diferentes niveles de E y NS3 observados en las células infectadas es que el procesamiento proteolítico de las proteínas no estructurales pudiera ser inhibido por W7 en las células infectadas con DENV. Es bien sabido que el corte de la proteína E es mediado por una proteasa celular, mientras que la NS3 está implicada en su propio procesamiento. Por lo tanto, W7 podría inhibir la actividad de la proteasa NS3-NS2B. Esta posibilidad está apoyada por los resultados que indican que otros inhibidores de CaM como Quercetina son capaces de inhibir la actividad de la proteasa viral (Senthilvel et al., 2013). Por lo tanto, el acoplamiento de W7 a la tríada catalítica de la proteasa NS3-NS2B se realizó utilizando el software Molegro, y una interacción putativa del antagonista W7 con la tríada catalítica de la proteasa viral se predijo con una puntuación MolDock de -92.502 (Figura 8). Esta interacción puede tener un efecto negativo en la actividad de la proteasa, lo que haría suponer que W7 podría tener la capacidad de inhibir la actividad de NS3.

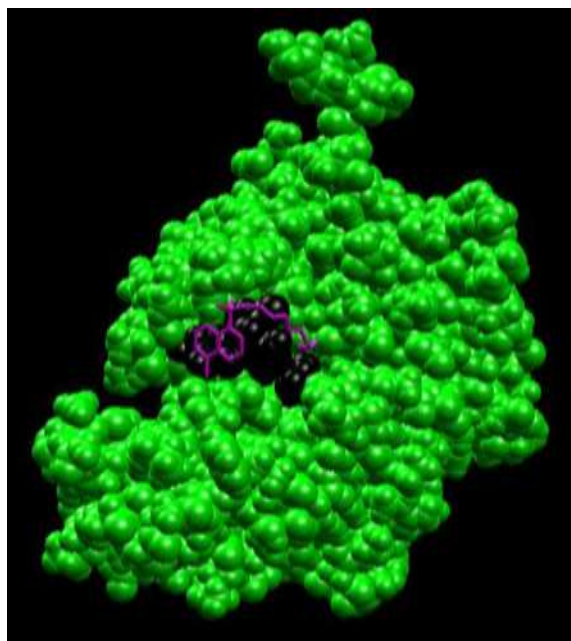


Fig.8 El antagonista de la calmodulina W7 mostró un posible sitio de interacción con la proteasa de DENV. W7 tienen un sitio de unión en el sitio catalítico de NS3, que se predijo con Molegro Virtual Docker. La proteasa de DENV NS3-NS2B se representa en color verde y la tríada catalítica (His51, Asp75 y Ser135) se muestra en negro, mientras que el ligando W7 en púrpura.

La proteína viral NS2A tiene un sitio de interacción putativo con CaM

Una segunda posibilidad es que CaM podría interactuar con una o más proteínas virales que participan en la replicación viral. Para determinar si una proteína viral podría interactuar con CaM, se analizó la secuencia completa de todas las proteínas codificadas por el RNA viral utilizando el software *Calmodulin target Database*. Así, se encontró un sitio de unión a CaM en la proteína NS2A (Figura 9A). La interacción probable entre ambas moléculas se evaluó también mediante un docking en donde pudimos sugerir con mayor certeza la posible interacción Calmodulina-NS2A con un puntaje de MolDock de 1982.426 (Figura 9B). Para aportar más evidencias a la posible interacción de NS2A con CaM, la secuencia de la proteína NS2A se clonó en el plásmido pProex HTA a. La expresión de la proteína rNS2A His-tag fue inducida por IPTG y la proteína recombinante fue purificada con ayuda de una resina de afinidad como se describe en la sección Materiales y Métodos. Se llevó a cabo la secuenciación completa del gen de la proteína rNS2A clonada y un Western blot con anticuerpos anti-His para corroborar la identidad de la proteína expresada. Después del lavado con diferentes concentraciones de imidazol, la proteína His-rNS2A acoplada a la resina se analizó mediante Western blot usando un anticuerpo policlonal anti-His. No se observaron bandas en la resina incubada con extractos de bacterias no inducidas transformadas con el mismo plásmido. Para el ensayo de cromatografía de afinidad, la proteína His-rNS2A, acoplada a la columna de cobalto, y la resina control se incubaron con extractos celulares de células Huh-7 no infectadas. La mayoría de las proteínas obtenidas en la fracción de elución interactuaron específicamente con His-rNS2A porque ninguna de ellas se observó en la fracción de elución del control negativo. Las proteínas obtenidas a partir de la fracción de elución se analizaron mediante Western blot usando anticuerpos dirigidos contra CaM. Se detectó una banda de aproximadamente 17 kDa a partir de la resina acoplada a la proteína His-rNS2A ausente en la fracción de elución del control negativo (Figura 9C), apoyando la idea de que NS2A es capaz de interactuar con CaM.

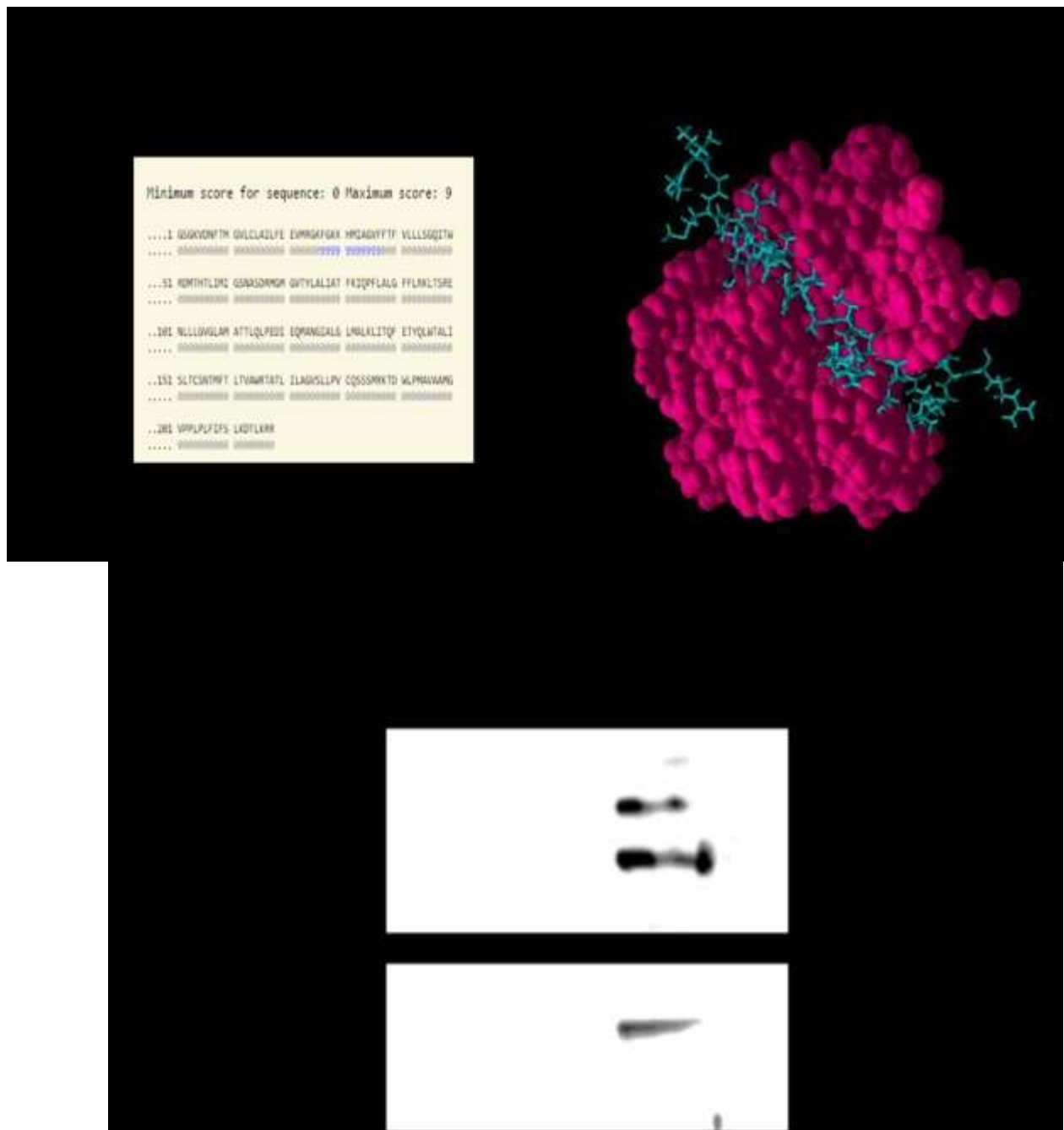


Fig.9 Interacción de CaM con NS2A. Se analizó la secuencia completa del RNA viral utilizando el software Calmodulin target Database. Se encontró un sitio de unión a CaM en la proteína NS2A (A). La interacción también se evaluó también mediante un docking que confirma la posible interacción Calmodulina-NS2A con un puntaje de MolDock de 1982.426 (B). Por otro lado para confirmar la posible interacción se llevó a cabo una cromatografía de afinidad que fue analizada mediante Western blot usando anticuerpos dirigidos contra CaM. Se detectó una banda de

aproximadamente 17 kDa a partir de la resina acoplada a la proteína His-rNS2A ausente en la fracción de elución del control negativo (C), apoyando la idea de que NS2A es capaz de interactuar con CaM.

Calreticulina colocaliza con la proteína E en células Infechadas.

Una vez establecida la participación de CaM, se evaluó la participación de Calreticulina durante la infección por DENV. Calreticulina es una proteína que cumple múltiples funciones en el organismo, está involucrada en respuesta inmunológica (Raghavan et al., 2013), en patologías como el cáncer (Zamanian et al., 2013) además de que ayuda al correcto plegamiento de proteínas (Michalak et al., 2009) y está involucrada en la homeóstasis de calcio en la célula (Bastianutto et al., 1995). Inicialmente, la distribución de Calreticulina en las células infectadas se evaluó mediante microscopía confocal mostrando que además de haber una marca más intensa de Calreticulina en las células infectadas hay una evidente colocalización de Calreticulina con la proteína de la Envoltura (Figura 10), sugiriendo cómo ya se había reportado previamente (Thawornchai Limjindaporn et al., 2009) una interacción entre ambas proteínas.

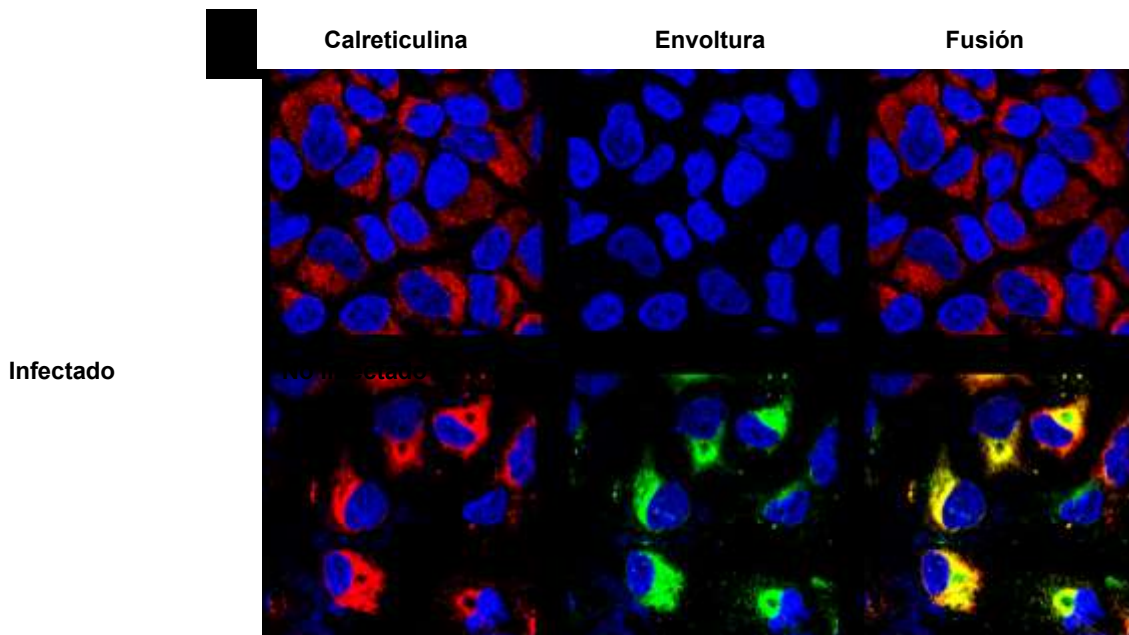


Fig.10 Calreticulina colocaliza con la proteína de la envoltura de DENV. Las células Huh-7 no infectadas o infectadas con DENV2 durante 24 horas fueron fijadas y teñidas con anticuerpos anti-CRT (rojo) y anti-E (verde). Los núcleos se contrastaron con Hoechst (azul). La ubicación de las proteínas se analizó mediante microscopía confocal. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

Calreticulina aumenta su expresión y se secreta en células infectadas.

Dado que un aumento en los niveles de Calreticulina ha sido relacionado con alteraciones en el metabolismo celular se decidió evaluar los niveles de esta proteína en respuesta a la infección por DENV, observando un aumento en los niveles de expresión de calreticulina (Figura 11A). Adicionalmente se evaluó la posibilidad de que Calreticulina estuviera siendo secretada en células infectadas ya que ha sido reportado previamente que esta proteína puede ser secretada activando vías relacionadas con la respuesta inmune (Raghavan et al., 2013). Midiendo la presencia de Calreticulina en los sobrnadantes de células infectadas encontramos que esta proteína es secretada durante la infección por DENV.



Fig.11 Calreticulina es sobreexpresada y secretada durante la infección por DENV.
(A) La expresión de Calreticulina en células Huh-7 infectadas con DENV2 por 48 horas fue analizada, mediante Western blot. (B) Para evaluar la secreción de Calreticulina, la presencia de ésta proteína fue analizada a partir de sobrenadantes de células fueron infectadas durante 12 horas y mantenidas en medio sin suero para evitar la interferencia de proteínas séricas, mediante Western-blot.

Discusión.

DENV es la enfermedad viral más importante transmitida por mosquitos y causa un grave problema de salud en todo el mundo, principalmente en regiones tropicales y subtropicales. La replicación de DENV ocurre en el RE (Uchil y Satchidanandam, 2003) que desempeña un papel crucial en la síntesis, el transporte y la modificación de proteínas y es el sitio para la biosíntesis, procesamiento y transporte de diversos lípidos (Schwarz y Blower, 2016) además de está involucrado en la homeostasis del Ca^{2+} . La homeostasis de Ca^{2+} . es esencial para la célula porque es un segundo mensajero implicado en la regulación de una variedad de procesos celulares tales como metabolismo, fosforilación y desfosforilación de proteínas, proliferación celular, diferenciación, transcripción de genes, motilidad celular y contracción muscular (Michael J. Berridge et al., 2003). Para cumplir su papel como segundo mensajero, el Ca^{2+} . se une a sus proteínas diana, incluyendo proteínas como CaM. CaM es una proteína prototipo de transducción de señales que es capaz de transducir las señales de Ca^{2+} a través de la modulación de la estructura y función de otras proteínas que no pueden unirse a Ca^{2+} (Van Eldik and Watterson, 1998). Dada la importancia de esta proteína nos preguntamos si podría desempeñar un papel durante la infección por DENV. La participación de CaM en las infecciones virales ha sido poco descrita, pero se ha reportado que es importante para el VIH modulando vías de señalización relacionadas con respuesta inmunológica mediante la interacción de CaM con proteínas de VIH (Hayashi et al., 2002; Matsubara et al., 2005; Radding et al., 2000). También se ha descrito que CaM es importante en la infección por inmunodeficiencia del simio (SIV) (Yuan et al., 1995) y para Rotavirus (Chattopadhyay et al., 2013). Específicamente, para la replicación de rotavirus se sabe que la fase S es importante para la acumulación viral y CaM y la activación de CaMKI son los inductores de la transición de la fase G1 a la fase S (Bhowmick et al., 2014).

En el caso de la infección por DENV se ha descrito que la proteína que induce la degradación de STAT2 depende de la función del complejo Ca^{2+} -CaM (Morrison et al., 2013), lo que sugiere que el complejo Ca^{2+} -CaM es importante para la replicación de DENV. Además, se sabe que la CaMK-II es necesaria para la fosforilación de la proteína celular vimentina que se necesita para mantener y soportar el ciclo replicativo de DENV (Teo and Chu, 2014). La fosforilación de vimentina también se requiere para la replicación de EV71 (Haolong et al., 2013). Por lo tanto, la fosforilación de vimentina y el reordenamiento de la membrana están desempeñando papeles importantes en la formación de los complejos de replicación.

Por estas razones, para evaluar la importancia de la función del complejo Ca^{2+} -CaM durante la infección por DENV, las células infectadas se incubaron con el antagonista de CaM W7 que impide la unión CaM a sus proteínas diana. Aunque nuestra primera observación fue que los niveles de expresión y la distribución de CaM no se alteraban durante la infección por DENV, se evaluó el efecto del tratamiento con W7 durante la infección por DENV. Se observó una reducción significativa en el porcentaje de células infectadas evaluado por citometría de flujo y por microscopía confocal en presencia de W7, además, el tratamiento indujo una reducción de más de un log en la progenie viral, lo que sugiere que el complejo Ca^{2+} -CaM es importante durante el ciclo de replicación DENV. Este resultado se confirmó cuando se observó una reducción significativa en la secreción de la proteína NS1 y en la síntesis de NS3 y RNA viral en células tratadas con W7. El efecto específico de W7 en el proceso de traducción/replicación de DENV- se obtuvo al analizar células Vero 4R transfectadas de forma estable con el replicón DENV4 (Alcaraz-Estrada et al., 2010) que fueron tratadas con 25 μM de W7. La reducción de la actividad luciferasa en células tratadas con W7 confirmó que el complejo Ca^{2+} -CaM es importante en el proceso de traducción-replicación de DENV.

Algunos antagonistas de CaM son anti-proliferativos en una diversidad de tipos celulares. Por esta razón, la proliferación, el crecimiento celular y la inducción de apoptosis se evaluaron en células tratadas con W7. No se observaron diferencias en el crecimiento celular o en la inducción de apoptosis entre células no tratadas y tratadas con W7, lo que confirma que la reducción en la replicación de DENV no estaba relacionada con una reducción en la proliferación celular o con la inducción de apoptosis celular. Para confirmar aún más que CaM desempeña un papel importante durante la infección por DENV, se evaluó el efecto de dos inhibidores diferentes de CaM (W5 y calmidazolium). Aunque ninguno de estos dos antagonistas de CaM redujo la proliferación celular, si inhibieron el ciclo replicativo de DENV, reduciendo la progenie viral. Por lo tanto, estos resultados apuntan al hecho de que CaM puede ser un buen objetivo para el diseño de antivirales. Tan es así, que, en un informe reciente, se demostró que el uso combinado del inhibidor de CaM pimozida y del inhibidor de la síntesis de ácidos grasos TOFA logran generar un efecto aditivo inhibitorio de la infección por chikunguya y tienen un efecto terapéutico in vivo (Karlás et al., 2016).

Por otra parte la fuerte colocalización entre NS3 y E presente en células no tratadas se redujo significativamente en células tratadas con W7. Una posibilidad para explicar este hecho fue que el tratamiento con W7 podría inhibir la reorganización de vimentina, reduciendo la formación de complejos replicativos de DENV. Sin embargo, no se detectaron diferencias en la organización de la vimentina en las células tratadas en comparación con las células no tratadas, lo que sugiere que la inhibición de la infección por DENV causada por W7 no está relacionada con la fosforilación y reorganización de la vimentina.

En el análisis de microscopía confocal de las células infectadas, se observó que W7 indujo una inhibición más fuerte en los niveles de expresión de NS3 que en la proteína E. Ambas proteínas son procesadas a partir de la misma poliproteína por diferentes proteasas. E es procesada por una proteasa celular mientras que la proteína NS3 se autoprocasa. Así, las diferencias en los niveles de expresión de ambas proteínas en las células tratadas podrían sugerir que la actividad de la proteasa NS2B-NS3 podría ser inhibida por W7. Otros inhibidores de calmodulina como la quercetina han demostrado tener un sitio de interacción con NS3 inhibiendo su actividad (de Sousa et al., 2015; Mata et al., 2015; Senthilvel et al., 2013). Para analizar la posibilidad de que W7 pudiera inhibir la actividad de NS2B-NS3 se realizó un análisis de Docking. Se predijo una posible interacción entre W7 y la tríada catalítica de la proteasa viral. Dado que esta interacción es con la tríada catalítica podría inducir una inhibición en la actividad de la proteasa viral que explicaría la inhibición en el ciclo replicativo viral.

Una tercera posibilidad es que algunas proteínas virales pudieran interactuar con el complejo Ca^{2+} -CaM favoreciendo la replicación viral. En este caso, se realizó un análisis in silico buscando un sitio de unión a CaM putativo usando las secuencias de las diferentes proteínas virales. Se predijo un sitio de unión al complejo Ca^{2+} -CaM en la secuencia de la proteína NS2A, posibilidad que se evaluó mediante un análisis de Docking. NS2A es una pequeña proteína asociada a la membrana (Mackenzie et al., 1998), implicada en la replicación del RNA viral (Chambers et al., 1989). Esta proteína también modula la respuesta antiviral de interferón (Liu et al., 2006, 2005, 2004), (Muñoz-Jordán et al., 2003) y está implicada en el ensamblaje y secreción de partículas virales (Kümmerer and Rice, 2002; Leung et al., 2008; Liu et al., 2003). El Docking predijo que esta interacción es probable. Utilizando un ensayo de cromatografía de afinidad se demostró que la proteína NS2A recombinante marcada con una bandera de histidinas fue capaz de interactuar con CaM in vitro. Se ha reportado que CaM es capaz de interactuar con proteínas de membrana tales como la ATPasa de calcio e incluso

directamente con membranas (Liu et al., 2012; Vincenzi et al., 1980) (Liu et al., 2012, Vincenzi et al., 1980) lo que apoya el hecho de que puede haber una interacción entre CaM y NS2A. El papel específico de la interacción entre NS2A y CaM es desconocido. Sin embargo, dada la ubicación de NS2A en los complejos replicativos, la interacción con CaM podría ser necesaria para la replicación viral. Además, es bien sabido que el complejo Ca^{2+} -CaM está desempeñando papeles importantes en otros procesos celulares como el metabolismo de los lípidos, la modificación del citoesqueleto y la expresión génica. Todas estas funciones podrían ser inhibidas por W7. Se requiere un análisis adicional para entender el papel específico de CaM en el ciclo replicativo de DENV.

En resumen, los antagonistas de CaM como W7 inhiben el ciclo replicativo de DENV reduciendo la traducción/replicación viral, la formación de complejos replicativos y el rendimiento viral. La inhibición de la actividad proteasa de NS2B-NS3 y/o de la función de NS2A podría ser parte del mecanismo de acción responsable del efecto de W7.

En el caso de Calreticulina se sabe que interactúa con la proteína E (T. Limjindaporn et al., 2009), sin embargo, la relevancia de esta interacción se desconoce. Una posibilidad es que dado que E es una proteína glicosilada y CRT tiene una importante función durante el proceso de glicosilación, puede estar actuando a ese nivel. Por otro lado, también se ha descrito que CRT interactúa con el genoma viral lo cual hace pensar que podría estar involucrada en la replicación y/o ensamblaje viral. Con estos antecedentes, y la posible participación de las proteínas dependientes de Ca^{2+} en la homeostásis de Ca^{2+} y en diversas funciones en el RE nos preguntamos si CRT pudieran alterar su expresión durante la infección con DENV. Nuestros resultados indican que hay un incremento en su expresión en respuesta a la infección por DENV, lo cual se ha descrito para otros virus como el HBV, donde se demostró que el incremento en los niveles de CRT está relacionado con la inhibición de la respuesta a interferón mediada por el virus (Yue et al., 2012), esto aunado a que la proteína es secretada en células infectadas y se sabe que esta secreción sirve como señal para modular la respuesta inmunológica (Raghavan et al., 2013) sugerimos que la modulación de

CRT en respuesta a la infección por DENV pudiera estar relacionada a una inhibición de la respuesta inmune. Sin embargo, son necesarios más análisis para poder afianzar esa conclusión.

Conclusiones

- Los inhibidores de CaM W7, W5 y Calmidazolium disminuyen la progenie viral de DENV.
- W7 afecta de manera diferencial los niveles de expresión de la proteína E y de NS3 sugiriendo una alteración en la actividad de la proteasa viral
- W7 parece tener la capacidad de unirse a la triada catalítica de la proteasa viral.
- La proteína viral NS2A interacciona con CaM, y esta interacción podría ser importante para el ciclo replicativo viral.
- Los niveles de expresión y secreción de Calreticulina se ven aumentados en respuesta a la infección por DENV lo que podría sugerir modulación de la respuesta inmune.

Perspectivas

- Determinar la importancia de la interacción de NS2A con Calmodulina durante el ciclo replicativo de Dengue.
- Evaluar si la interacción de la proteína NS2A con Calmodulina depende de la presencia de Ca^{2+} .
- Evaluar los niveles de ARNm de Calreticulina.
- Evaluar el comportamiento de proteínas de respuesta inmune en función de la expresión de Calreticulina durante la infección por Dengue.

Referencias.

- Alcaraz-Estrada, S.L., Manzano, M.I.M., Del Angel, R.M., Levis, R., Padmanabhan, R., 2010. Construction of a dengue virus type 4 reporter replicon and analysis of temperature-sensitive mutations in non-structural proteins 3 and 5. *J. Gen. Virol.* 91, 2713–2718. doi:10.1099/vir.0.024083-0
- Allison, S.L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C.W., Kunz, C., Heinz, F.X., 1995. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J. Virol.* 69, 695–700.
- Avirutnan, P., Zhang, L., Punyadee, N., Manuyakorn, A., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Malasit, P., Atkinson, J.P., Diamond, M.S., 2007. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog.* 3, e183.
- Bastianutto, C., Clementi, E., Codazzi, F., Podini, P., De Giorgi, F., Rizzuto, R., Meldolesi, J., Pozzan, T., 1995. Overexpression of calreticulin increases the Ca²⁺ capacity of rapidly exchanging Ca²⁺ stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function. *J. Cell Biol.* 130, 847.
- Bazan, J.F., Fletterick, R.J., 1989. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestviruses. *Virology* 171, 637–639.
- Berridge, M.J., 1995. Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* 312, 1.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529. doi:10.1038/nrm1155
- Bhowmick, R., Banik, G., Chanda, S., Chattopadhyay, S., Chawla-Sarkar, M., 2014. Rotavirus infection induces G1 to S phase transition in MA104 cells via Ca²⁺/Calmodulin pathway. *Virology* 454–455, 270–279. doi:10.1016/j.virol.2014.03.001
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E.A., others, 2010. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res.* 87, 125–148.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., others, 2001. Calcium signalling—an overview, in: *Seminars in Cell & Developmental Biology*. pp. 3–10.
- Catteau, A., Kalinina, O., Wagner, M.C., Deubel, V., Courageot, M.P., Desprès, P., 2003. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J. Gen. Virol.* 84, 2781.
- Chambers, T.J., McCourt, D.W., Rice, C.M., 1989. Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. *Virology* 169, 100–109.
- Chambers, T.J., Weir, R.C., Grakoui, A., McCourt, D.W., Bazan, J.F., Fletterick, R.J., Rice, C.M., 1990. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 8898.

- Chattopadhyay, S., Basak, T., Nayak, M.K., Bhardwaj, G., Mukherjee, A., Bhowmick, R., Sengupta, S., Chakrabarti, O., Chatterjee, N.S., Chawla-Sarkar, M., 2013. Identification of cellular calcium binding protein calmodulin as a regulator of rotavirus A infection during comparative proteomic study. *PloS One* 8, e56655. doi:10.1371/journal.pone.0056655
- Clapham, D.E., 2007. Calcium signaling. *Cell* 131, 1047–1058.
- Clyde, K., Kyle, J.L., Harris, E., 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol.* 80, 11418.
- Cunningham, M.W., Fujinami, R.S., 1999. Effects of microbes on the immune system. *Recherche* 67, 2.
- De Maio, F.A., Risso, G., Iglesias, N.G., Shah, P., Pozzi, B., Gebhard, L.G., Mammi, P., Mancini, E., Yanovsky, M.J., Andino, R., Krogan, N., Srebrow, A., Gamarnik, A.V., 2016. The Dengue Virus NS5 Protein Intrudes in the Cellular Spliceosome and Modulates Splicing. *PLoS Pathog.* 12, e1005841. doi:10.1371/journal.ppat.1005841
- de Sousa, L.R.F., Wu, H., Nebo, L., Fernandes, J.B., da Silva, M.F. das G.F., Kiefer, W., Kanitz, M., Bodem, J., Diederich, W.E., Schirmeister, T., Vieira, P.C., 2015. Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: inhibition kinetics and docking studies. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 466–470. doi:10.1016/j.bmc.2014.12.015
- Denning, G.M., Leidal, K.G., Holst, V.A., Iyer, S.S., Pearson, D.W., Clark, J.R., Nauseef, W.M., Clark, R.A., 1997. Calreticulin biosynthesis and processing in human myeloid cells: demonstration of signal peptide cleavage and N-glycosylation. *Blood* 90, 372.
- Diamond, M.S., Edgil, D., Roberts, T.G., Lu, B., Harris, E., 2000. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J. Virol.* 74, 7814–7823.
- Egloff, M., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J., Canard, B., 2002. An RNA cap (nucleoside-2 [prime prime or minute]-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J* 21, 2757–2768.
- Elshuber, S., Allison, S.L., Heinz, F.X., Mandl, C.W., 2003. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 84, 183–191.
- Fliegel, L., Burns, K., MacLennan, D.H., Reithmeier, R.A., Michalak, M., 1989. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 264, 21522–21528.
- Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W.H., Zarski, J.P., Drouet, E., 2002. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* 292, 162–168.
- Haolong, C., Du, N., Hongchao, T., Yang, Y., Wei, Z., Hua, Z., Wenliang, Z., Lei, S., Po, T., 2013. Enterovirus 71 VP1 activates calmodulin-dependent protein kinase II and results in the rearrangement of vimentin in human astrocyte cells. *PloS One* 8, e73900. doi:10.1371/journal.pone.0073900

- Hayashi, N., Matsubara, M., Jinbo, Y., Titani, K., Izumi, Y., Matsushima, N., 2002. Nef of HIV-1 interacts directly with calcium-bound calmodulin. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 11, 529–537. doi:10.1110/ps.23702
- Heaton, N.S., Perera, R., Berger, K.L., Khadka, S., LaCount, D.J., Kuhn, R.J., Randall, G., 2010. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 17345–17350.
- Hovnanian, A., 2008. SERCA pumps and human diseases. *Calcium Signal. Dis.* 337–363.
- Hung, S.L., Lee, P.L., Chen, H.W., Chen, L.K., Kao, C.L., King, C.C., 1999. Analysis of the steps involved in dengue virus entry into host cells. *Virology* 257, 156–167.
- Imbert, J.L., Guevara, P., Ramos-Castañeda, J., Ramos, C., Sotelo, J., 1994. Dengue virus infects mouse cultured neurons but not astrocytes. *J. Med. Virol.* 42, 228–233.
- Jethmalani, S.M., Henle, K.J., 1998. Calreticulin associates with stress proteins: implications for chaperone function during heat stress. *J. Cell. Biochem.* 69, 30–43.
- Jethmalani, S.M., Henle, K.J., Kaushal, G.P., 1994. Heat shock-induced prompt glycosylation. Identification of P-SG67 as calreticulin. *J. Biol. Chem.* 269, 23603–23609.
- Jones, C.T., Ma, L., Burgner, J.W., Groesch, T.D., Post, C.B., Kuhn, R.J., 2003. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J. Virol.* 77, 7143–7149.
- Karlas, A., Berre, S., Couderc, T., Varjak, M., Braun, P., Meyer, M., Gangneux, N., Karo-Astover, L., Weege, F., Raftery, M., Schönrich, G., Klemm, U., Wurzbauer, A., Bracher, F., Merits, A., Meyer, T.F., Lecuit, M., 2016. A human genome-wide loss-of-function screen identifies effective chikungunya antiviral drugs. *Nat. Commun.* 7, 11320. doi:10.1038/ncomms11320
- 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, 2367–2381.
- Kiermayr, S., Kofler, R.M., Mandl, C.W., Messner, P., Heinz, F.X., 2004. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. *J. Virol.* 78, 8078–8084.
- Krishna, V.D., Rangappa, M., Satchidanandam, V., 2009. Virus-specific cytolytic antibodies to nonstructural protein 1 of Japanese encephalitis virus effect reduction of virus output from infected cells. *J. Virol.* 83, 4766–4777.
- Kümmerer, B.M., Rice, C.M., 2002. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J. Virol.* 76, 4773–4784.
- Lai, M., 1998. Cellular Factors in the Transcription and Replication of Viral RNA Genomes: A Parallel to DNA-Dependent RNA Transcription* 1. *Virology* 244, 1–12.
- Lee, E., Lobigs, M., 2000. Substitutions at the putative receptor-binding site of an encephalitic flavivirus alter virulence and host cell tropism and reveal a role for glycosaminoglycans in entry. *J. Virol.* 74, 8867–8875.

- Leung, J.Y., Pijlman, G.P., Kondratieva, N., Hyde, J., Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., 2008. Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. *J. Virol.* 82, 4731–4741. doi:10.1128/JVI.00002-08
- Limjindaporn, T., Wongwiwat, W., Noisakran, S., Srisawat, C., Netsawang, J., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Avirutnan, P., 2009. Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 196–200.
- Limjindaporn, T., Wongwiwat, W., Noisakran, S., Srisawat, C., Netsawang, J., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Avirutnan, P., Thiemmecca, S., Sriburi, R., Sittisombut, N., Malasit, P., Yenchitsomanus, P., 2009. Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 196–200. doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.070
- Lin, C.F., Lei, H.Y., Shiau, A.L., Liu, H.S., Yeh, T.M., Chen, S.H., Liu, C.C., Chiu, S.C., Lin, Y.S., 2002. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J. Immunol.* 169, 657–664.
- Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 59, 23–61.
- Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 2001. Flaviviridae: the viruses and their replication. *Fields Virol.* 1, 991–1041.
- Liu, W.J., Chen, H.B., Khromykh, A.A., 2003. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J. Virol.* 77, 7804–7813.
- Liu, W.J., Chen, H.B., Wang, X.J., Huang, H., Khromykh, A.A., 2004. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J. Virol.* 78, 12225–12235. doi:10.1128/JVI.78.22.12225-12235.2004
- Liu, W.J., Wang, X.J., Clark, D.C., Lobigs, M., Hall, R.A., Khromykh, A.A., 2006. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J. Virol.* 80, 2396–2404. doi:10.1128/JVI.80.5.2396-2404.2006
- Liu, W.J., Wang, X.J., Mokhonov, V.V., Shi, P.-Y., Randall, R., Khromykh, A.A., 2005. Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. *J. Virol.* 79, 1934–1942. doi:10.1128/JVI.79.3.1934-1942.2005
- Liu, Y., Zheng, X., Mueller, G.A., Sobhany, M., DeRose, E.F., Zhang, Y., London, R.E., Birnbaumer, L., 2012. Crystal structure of calmodulin binding domain of orai1 in complex with Ca²⁺ calmodulin displays a unique binding mode. *J. Biol. Chem.* 287, 43030–43041. doi:10.1074/jbc.M112.380964

- Ma, L., Jones, C.T., Groesch, T.D., Kuhn, R.J., Post, C.B., 2004. Solution Structure of Dengue Virus Capsid Protein Reveals Another Fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3414–3419. doi:10.1073/pnas.0305892101
- Mackenzie, J., 2005. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic* 6, 967–977.
- Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., Jones, M.K., Westaway, E.G., 1998. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* 245, 203–215. doi:10.1006/viro.1998.9156
- Martina, B.E.E., Koraka, P., Osterhaus, A.D.M.E., 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 564.
- Mason, P.W., McAda, P.C., Mason, T.L., Fournier, M.J., 1987. Sequence of the dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS1. *Virology* 161, 262–267. doi:10.1016/0042-6822(87)90196-6
- Mata, R., Figueroa, M., González-Andrade, M., Rivera-Chávez, J.A., Madariaga-Mazón, A., Del Valle, P., 2015. Calmodulin inhibitors from natural sources: an update. *J. Nat. Prod.* 78, 576–586. doi:10.1021/np500954x
- Matsubara, M., Jing, T., Kawamura, K., Shimojo, N., Titani, K., Hashimoto, K., Hayashi, N., 2005. Myristoyl moiety of HIV Nef is involved in regulation of the interaction with calmodulin in vivo. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 14, 494–503. doi:10.1110/ps.04969605
- McBride, W.J.H., Bielefeldt-Ohmann, H., 2000. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect.* 2, 1041–1050.
- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L.I., Opas, M., 2009. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 417, 651–666. doi:10.1042/BJ20081847
- Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S., Bartenschlager, R., 2007. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J. Biol. Chem.* 282, 8873–8882. doi:10.1074/jbc.M609919200
- Miller, S., Krijnse-Locker, J., 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 363–374.
- Miller, S., Sparacio, S., Bartenschlager, R., 2006. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J. Biol. Chem.* 281, 8854–8863. doi:10.1074/jbc.M512697200
- Morrison, J., Laurent-Rolle, M., Maestre, A.M., Rajsbaum, R., Pisanelli, G., Simon, V., Mulder, L.C.F., Fernandez-Sesma, A., García-Sastre, A., 2013. Dengue Virus Co-opts UBR4 to Degrade STAT2 and Antagonize Type I Interferon Signaling. *PLOS Pathog* 9, e1003265. doi:10.1371/journal.ppat.1003265
- Mosso, C., Galván-Mendoza, I.J., Ludert, J.E., del Angel, R.M., 2008. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* 378, 193–199.
- Muñoz-Jordán, J.L., Sánchez-Burgos, G.G., Laurent-Rolle, M., García-Sastre, A., 2003. Inhibition of Interferon Signaling by Dengue Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 14333–14338. doi:10.1073/pnas.2335168100

- Naik, N.G., Wu, H.-N., 2015. Mutation of Putative N-Glycosylation Sites on Dengue Virus NS4B Decreases RNA Replication. *J. Virol.* 89, 6746–6760. doi:10.1128/JVI.00423-15
- Nemésio, H., Palomares-Jerez, F., Villalaín, J., 2012. NS4A and NS4B proteins from dengue virus: membranotropic regions. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2818–2830. doi:10.1016/j.bbamem.2012.06.022
- Noisakran, S., Dechtawewat, T., Avirutnan, P., Kinoshita, T., Siripanyaphinyo, U., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Malasit, P., Sittisombut, N., 2008. Association of dengue virus NS1 protein with lipid rafts. *J. Gen. Virol.* 89, 2492–2500.
- Nomaguchi, M., Ackermann, M., Yon, C., You, S., Padmanbhan, R., 2003. De novo synthesis of negative-strand RNA by dengue virus RNA-dependent RNA polymerase in vitro: nucleotide, primer, and template parameters. *J. Virol.* 77, 8831.
- OMS, 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. World Health Organization.
- P. Simmons, C., J. Farrar, J., van Vinh Chau, N., Wills, B., 2012. Dengue. *N. Engl. J. Med.* 15.
- Perera, R., Khaliq, M., Kuhn, R.J., 2008. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res.* 80, 11–22.
- Perera, R., Kuhn, R.J., 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 369–377.
- Periasamy, M., Kalyanasundaram, A., 2007. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 35, 430–442.
- Qi, R., Zhang, L., Chi, C., 2008. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 40, 91–101.
- Radding, W., Williams, J.P., McKenna, M.A., Tummala, R., Hunter, E., Tytler, E.M., McDonald, J.M., 2000. Calmodulin and HIV type 1: interactions with Gag and Gag products. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 1519–1525. doi:10.1089/088922200750006047
- Raghavan, M., Wijeyesakere, S.J., Peters, L.R., Del Cid, N., 2013. Calreticulin in the immune system: ins and outs. *Trends Immunol.* 34, 13–21. doi:10.1016/j.it.2012.08.002
- Salonen, A., Ahola, T., Kääriäinen, L., 2005. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Membr. Traffick. Viral Replication* 139–173.
- Samsa, M.M., Mondotte, J.A., Iglesias, N.G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A.T., Bozza, P.T., Gamarnik, A.V., 2009. Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. *PLoS Pathog* 5, e1000632. doi:10.1371/journal.ppat.1000632
- Schlesinger, J.J., 2006. Flavivirus nonstructural protein NS1: Complementary surprises. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 18879–18880.
- Schneemann, A., 2006. The Structural and Functional Role of RNA in Icosahedral Virus Assembly. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 51–67. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142304
- Schwarz, D.S., Blower, M.D., 2016. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 79–94. doi:10.1007/s00018-015-2052-6

- Senthilvel, P., Lavanya, P., Kumar, K.M., Swetha, R., Anitha, P., Bag, S., Sarveswari, S., Vijayakumar, V., Ramaiah, S., Anbarasu, A., 2013. Flavonoid from *Carica papaya* inhibits NS2B-NS3 protease and prevents Dengue 2 viral assembly. *Bioinformation* 9, 889–895. doi:10.6026/97320630009889
- Stern, O., Hung, Y.-F., Valdaou, O., Yaffe, Y., Harris, E., Hoffmann, S., Willbold, D., Sklan, E.H., 2013. An N-terminal amphipathic helix in dengue virus nonstructural protein 4A mediates oligomerization and is essential for replication. *J. Virol.* 87, 4080–4085. doi:10.1128/JVI.01900-12
- Stiasny, K., Heinz, F.X., 2006. Flavivirus membrane fusion. *J. Gen. Virol.* 87, 2755–2766.
- Suaya, J.A., Shepard, D.S., Siqueira, J.B., Martelli, C.T., Lum, L., Tan, L.H., Kongsin, S., Jiamton, S., Garrido, F., Montoya, R., others, 2009. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 846.
- Tassaneetrithep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D.L., others, 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 823.
- Teo, C.S.H., Chu, J.J.H., 2014. Cellular Vimentin Regulates Construction of Dengue Virus Replication Complexes through Interaction with NS4A Protein. *J. Virol.* 88, 1897–1913. doi:10.1128/JVI.01249-13
- Tio, P.H., Jong, W.W., Cardoso, M.J., others, 2005. Two dimensional VOPBA reveals laminin receptor (LAMR1) interaction with dengue virus serotypes 1, 2 and 3. *Virol J* 2, 25.
- Uchil, P.D., Satchidanandam, V., 2003. Architecture of the flaviviral replication complex. Protease, nuclease, and detergents reveal encasement within double-layered membrane compartments. *J. Biol. Chem.* 278, 24388–24398. doi:10.1074/jbc.M301717200
- Umareddy, I., Chao, A., Sampath, A., Gu, F., Vasudevan, S.G., 2006. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J. Gen. Virol.* 87, 2605–2614. doi:10.1099/vir.0.81844-0
- Urbanowski, M.D., Ilkow, C.S., Hobman, T.C., 2008. Modulation of signaling pathways by RNA virus capsid proteins. *Cell. Signal.* 20, 1227–1236.
- Van Der Schaar, H.M., Rust, M.J., Chen, C., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X., Smit, J.M., 2008. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.* 4, e1000244.
- Van Der Schaar, H.M., Rust, M.J., Waarts, B.L., van der Ende-Metselaar, H., Kuhn, R.J., Wilschut, J., Zhuang, X., Smit, J.M., 2007. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J. Virol.* 81, 12019–12028.
- VAN ELDIK, L.J., WATTERSON, D.M., 1998. 1 - Calmodulin and Calcium Signal Transduction: An Introduction, in: *Calmodulin and Signal Transduction*. Academic Press, San Diego, pp. 1–15.

- Vincenzi, F.F., Hinds, T.R., Raess, B.U., 1980. Calmodulin and the Plasma Membrane Calcium Pump. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 356, 232–244. doi:10.1111/j.1749-6632.1980.tb29614.x
- Vogel, H.J., 1994. Calmodulin: a versatile calcium mediator protein. *Biochem. Cell Biol.* 72, 357–376. doi:10.1139/o94-049
- Wang, S.H., Syu, W.J., Hu, S.T., 2004. Identification of the homotypic interaction domain of the core protein of dengue virus type 2. *J. Gen. Virol.* 85, 2307–2314.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K.E., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., Bartenschlager, R., 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5, 365–375.
- Wilder-Smith, A., Gubler, D.J., 2008. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Med. Clin. North Am.* 92, 1377–1390.
- Wilder-Smith, A., Ooi, E.E., Vasudevan, S.G., Gubler, D.J., 2010. Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 12, 157–164.
- Yocupicio-Monroy, R.M.E., Medina, F., Reyes-del Valle, J., del Angel, R.M., 2003. Cellular proteins from human monocytes bind to dengue 4 virus minus-strand 3'untranslated region RNA. *J. Virol.* 77, 3067.
- Yuan, T., Mietzner, T.A., Montelaro, R.C., Vogel, H.J., 1995. Characterization of the calmodulin binding domain of SIV transmembrane glycoprotein by NMR and CD spectroscopy. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 10690–10696.
- Yue, X., Wang, H., Zhao, F., Liu, S., Wu, J., Ren, W., Zhu, Y., 2012. Hepatitis B virus-induced calreticulin protein is involved in IFN resistance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189, 279–286. doi:10.4049/jimmunol.1103405
- Zamanian, M., Veerakumarasivam, A., Abdullah, S., Rosli, R., 2013. Calreticulin and cancer. *Pathol. Oncol. Res. POR* 19, 149–154. doi:10.1007/s12253-012-9600-2
- Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P.R., Zhang, W., Pletnev, S.V., Sedlak, D., Baker, T.S., Strauss, J.H., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2003. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.* 22, 2604–2613.
- Zhang, Y., Zhang, W., Ogata, S., Clements, D., Strauss, J.H., Baker, T.S., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2004. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure* 12, 1607–1618.
- Zhou, Y., Frey, T.K., Yang, J.J., 2009. Viral calciomics: interplays between Ca²⁺ and virus. *Cell Calcium* 46, 1–17.
- Zou, J., Xie, X., Wang, Q.-Y., Dong, H., Lee, M.Y., Kang, C., Yuan, Z., Shi, P.-Y., 2015. Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. *J. Virol.* 89, 3455–3470. doi:10.1128/JVI.03453-14