



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA PROTEÍNA
NO ESTRUCTURAL 5 DE DENV-2 Y PROTEÍNAS
NUCLEARES

TESIS

Que presenta

SOFÍA CARRILLO HALFON

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Directora de Tesis:

DRA. LETICIA CEDILLO BARRÓN

DIRECTORA

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Investigadora Titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN

ASESORES

Dra. Rosaura Hernández Rivas

Investigadora Titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Investigador Titular del departamento de Biomedicina Molecular

CINVESTAV-IPN

Dr. Arturo Rojo Domínguez

Profesor Titular del departamento de Ciencias Naturales

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Cuajimalpa

Dr. Moisés León Juárez

Investigador Titular en Ciencias Biomédicas en el departamento de

Inmunobioquímica

Instituto Nacional de Perinatología

Esta tesis fue realizada en el departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría de la Dra. Leticia Cedillo Barrón.

Para la realización de la maestría, se obtuvo la beca número 367886 otorgada por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), institución a la cual le agradezco el apoyo económico brindado durante el desarrollo de dicho trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi padres por la persona que soy hoy, por su apoyo y a mi familia por creer en mí todo este tiempo.

A la Dra. Leticia Cedillo Barrón por permitirme trabajar en su laboratorio y por su guía, pero sobre todo por sus consejos, y su amistad.

A la Dra. Rosaura Hernández Rivas, por su asesoría y por siempre estar dispuesta a escucharme.

Al Dr. Arturo Rojo Domínguez, por apoyarme a lo largo del proyecto con sus conocimientos sobre proteómica y por su calidez humana.

Al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, por sus consejos y su asesoría en la parte experimental.

A Julio García Cordero, por su apoyo en todo momento durante la fase experimental. Sin su apoyo este trabajo no se hubiera realizado. Pero sobre todo le agradezco por su amistad.

A Froylán Ramírez Gómez, por su apoyo técnico.

A Raúl Bonilla, por su apoyo durante la fase experimental.

A Moisés, Joss, Alfredo, Gio, May, Paola, Gaurav y Olivia, por su apoyo y su amistad.

A Jorge, por siempre estar ahí para mí e impulsarme para ser cada día una mejor persona.

A Maru Maqueda, por todo su apoyo académico y por siempre tener una sonrisa en la cara.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	2
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
<i>CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DEL DENGUE</i>	11
<i>GENOMA VIRAL</i>	12
<i>PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO</i>	14
<i>ENSAMBLE Y LIBERACIÓN DE LOS VIRIONES</i>	14
PROTEÍNAS ESTRUCTURALES	15
<i>PROTEÍNA E</i>	15
<i>PROTEÍNA prM</i>	16
<i>PROTEÍNA DE CÁPSIDE</i>	16
PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES	17
<i>PROTEÍNA NS1</i>	17
<i>PROTEÍNAS NS2A y NS2B</i>	17
<i>PROTEÍNA NS3</i>	18
<i>PROTEÍNAS NS4A y NS4B</i>	18
PROTEÍNA NS5	20
<i>DOMINIO DE METILTRANSFERASA DE NS5</i>	20
Formación del CAP viral	21
Actividad enzimática	22
Estructura del dominio de MTasa	24
Subdominio N-terminal	26

DOMINIO DE RdRp	27
Síntesis de RNA viral	27
Estructura	28
El subdominio de la palma	29
El subdominio de los dedos	30
El subdominio del pulgar	30
FOSFORILACIÓN DE NS5	30
INTERACCIONES DE NS5	31
LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NS5	33
VIRUS DE RNA Y SU INTERACCIÓN CON EL NUCLÉOLO	36
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL NUCLÉOLO	36
Nucleofosmina	39
LOS VIRUS Y EL NUCLÉOLO	40
Los flavivirus y el nucléolo	42
JUSTIFICACIÓN	44
HIPÓTESIS	45
OBJETIVO GENERAL	45
OBJETIVOS PARTICULARES	45
MATERIAL Y MÉTODOS	46
PROPAGACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL VIRUS	46
MÉTODO DE TITULACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE POR ENSAYO DE PLACAS EN CÉLULAS VERO	46
EXTRACCIÓN DE RNA	47
SÍNTESIS DE cDNA	48
EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NS5	48
PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	49
TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS	49
INDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE NS5	49
PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA NS5	50

<i>ENSAYO DE WESTERN-BLOT</i>	51
<i>FRACCIONAMIENTO CELULAR</i>	52
<i>ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN</i>	52
<i>ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA</i>	53
<i>ENSAYOS DE KNOCKDOWN</i>	54
Preparación de los complejos	54
Proporción siRNA (μg) a reactivos de transfección (μl)	54
<i>ENSAYOS DE DOCKING</i>	55
RESULTADOS	57
<i>COLOCALIZACIÓN ENTRE NS5 Y PROTEÍNAS NUCLEARES</i>	57
<i>INTERACCIONES ENTRE NS5 Y PROTEÍNAS NUCLEARES</i>	60
<i>EFFECTO DEL KNOCKDOWN DE B23 SOBRE LA EXPRESIÓN DE NS5</i>	64
<i>EFFECTO DEL KNOCKDOWN DE B23 SOBRE LA REPLICACIÓN VIRAL</i>	68
<i>ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE B23 Y LA PROTEÍNA NS5 DEL VIRUS DENGUE POR ENSAYOS DE DOCKING</i>	68
DISCUSIÓN	72
CONCLUSIONES	80
PERSPECTIVAS	80
REFERENCIAS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de la infección por DENV en 2019	10
Figura 2. Estructura del virión y conformaciones de la proteína E	12
Figura 3. Procesamiento de la poliproteína	14
Figura 4. Formación del cap viral	22
Figura 5. Estructura de la MTasa de NS5	24
Figura 6. Estructura de la RdRp de NS5	29
Figura 7. Estructura del nucléolo	38
Figura 8. Caracterización de la infección	58
Figura 9. Evaluación de la colocalización entre NS5 y LMNA/C	59
Figura 10. Evaluación de la colocalización entre NS5 y B23	60
Figura 11. Preparación de fracciones	62
Figura 12. Análisis de las fracciones nucleares inmunoprecipitadas con un anticuerpo específico contra LMNA	62
Figura 13. Análisis de las fracciones nucleares inmunoprecipitadas contra con un anticuerpo específico contra B23	63
Figura 14. Resultados de la espectrometría de masas	64
Figura 15. Ensayo de viabilidad celular	64
Figura 16. Inhibición de B23	66
Figura 17. Evaluación de la expresión de B23 y NS5	67
Figura 18. Evaluación de la expresión de NS5	67
Figura 19. Evaluación del efecto de la disminución de la expresión de B23 sobre el título viral	68
Figura 20. Evaluación de los residuos que participan en la interacción entre NS5 y B23	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de los reactivos del kit NE-PER Nuclear & Cytoplasmic Extraction con el volumen celular	52
Tabla 2. Evaluación de la homología entre las secuencias reportadas de NS5.	55
Tabla 3. Evaluación de los residuos de NS5 más sobrerrepresentados en los 150 modelos.....	71

ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio
β -gal	β -galactosidasa
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Proteína de cápside
CD-14	Antígeno de diferenciación mieloide
CO ₂	Dióxido de carbono
C-terminal	Carboxilo-terminal
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
DC-SIGN	no integrina de unión a ICAM-3 específica de células dendríticas
DENV	virus del dengue
DENV-1	virus del dengue serotipo 1
DENV-2	virus del dengue serotipo 2
DENV-3	virus del dengue serotipo 3
DENV-4	virus del dengue serotipo 4
DF	fiebre por dengue
DHF	fiebre hemorrágica por dengue
DNA	ácido desoxirribonucleico

dNTP	dinucleótidos trifosfatados
DOPE	Energía Proteica Optimizada Discreta
dsRNA	RNA de doble cadena
DSS	Síndrome de choque por dengue
E	Proteína de envoltura
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo inmunológico acoplado a enzimas
ER	Retículo endoplásmico
F	Fenilalanina
G	Glicina
GAG	Glucosaminoglicano
GFP	Proteína verde fluorescente
GMP	Guanosín monofosfato
GST	Glutati3n S-transferasa
GTasa	Guanililtransferasa
GTP	Guanosín trifosfato
H	Histidina
hpi	Horas posinfecci3n
HRP	Peroxidasa de r3bano picante
I	Isoleucina

IFA	Inmunofluorescencia
IPTG	Isopropil tiogalactósido
IL-8	Interleucina 8
JEV	Virus de la encefalitis japonesa
K	Lisina
kDa	kiloDaltons
L	leucina
M	proteína de membrana
M	Molar
MEM	Medio mínimo esencial
MOI	Multiplicidad de infección
MTasa	Metiltransferasa
N	Asparragina
NLS	Sitio de localización nuclear
N-terminal	Amino terminal
NS1	Proteína no estructural 1
NS2A	Proteína no estructural 2A
NS2B	Proteína no estructural 2B
NS3	Proteína no estructural 3
NS4A	Proteína no estructural 4A
NS4B	Proteína no estructural 4B
NS5	Proteína no estructural 5

NS5-MTasa	Región de metiltransferasa de la proteína NS5
NTP	Nucleótido trifosfatado
O.D.	Densidad óptica
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
prM	Proteína prM
Q	Glutamina
R	Arginina
RdRp	RNA Polimerasa dependiente de RNA
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Revoluciones por minuto
RTPasa	RNA trifosfatasa
S	Serina
S	Svedberg
SAM	S-adenosil-L-metionina
SFB	Suero fetal bovino
ssRNA	RNA de cadena sencilla
STAT2	Transductor de señales y activador de la transcripción 2
T	Treonina

TBEV	Virus de la encefalitis transmitida por chinche
TGN	Red trans-Golgi
UFP	Unidades formadoras de placas
UTR	Región no traducida
V	Valina
W	Triptófano
WB	Western-Blot
WNV	Virus del Oeste del Nilo
YFV	Virus de la Fiebre Amarilla

RESUMEN

NS5 es una proteína flaviviral multifuncional involucrada en la replicación viral y la formación del cap viral. En algunos flavivirus se ha identificado la localización nuclear de esta proteína, pero su función dentro de este compartimento sigue sin dilucidarse. Basándonos en interactomas ya reportados de NS5, reportes de interacción de otras proteínas flavivirales, y un reporte previo de nuestro propio grupo, seleccionamos dos proteínas nucleares para evaluar su posible interacción con la proteína NS5 del virus del dengue 2 (DENV-2). A partir de un reporte previo de nuestro grupo (García-Cordero, Carrillo-Halfon et al. 2014), seleccionamos a la proteína LMNA/C debido a que observamos un alto grado de colocalización con NS5. Asimismo, partiendo de la observación del enriquecimiento de NS5 en los nucléolos de células infectadas, utilizamos a la proteína B23 como marcador nucleolar y observamos un alto grado de colocalización, por lo que buscamos evaluar la interacción entre estas dos proteínas nucleares y la proteína NS5.

A través de ensayos de inmunofluorescencia y ensayos bioquímicos, evaluamos la interacción entre la proteína NS5 y las proteínas B23 y LMNA/C. A través de ensayos de knockdown utilizando un siRNA específico contra B23, observamos un efecto en la expresión de NS5 en células infectadas. De igual manera, observamos una reducción en el título viral en presencia del siRNA contra B23, lo que sugiere que esta interacción es importante para la formación de la partícula viral madura. A través de ensayos de docking, identificamos una región en el dominio de metiltransferasa rico en argininas que podría estar involucrada en la interacción con B23, ya que se ha reportado que B23 posee una región cargada negativamente capaz de unirse a aminoácidos cargados positivamente, como la arginina (Lobaina and Perera 2019). Elucidar el mecanismo por el cual NS5 y B23 se asocian es importante para comprender un poco más sobre cómo DENV manipula los procesos celulares que conducen a la patogénesis, así como proponer estrategias para el desarrollo de fármacos contra esta familia de virus.

ABSTRACT

NS5 is a flaviviral protein involved in viral replication and Cap formation. In some flaviviruses, it has been identified inside the nucleus of infected cells, but its nuclear function(s) remains elusive. Here, we have selected two nuclear proteins, based on several interactomes reported, previous interaction studies with other flaviviral proteins and previous reports from our group. Based on a previous report from our group (Garcia-Cordero, Carrillo-Halfon et al. 2014), we selected LMNA/C protein due to the observation of a high degree of colocalization with NS5. Likewise, through the observation of aggregation of NS5 inside the nucleolus of infected cells, we used B23 as a nucleolar marker and we observed a high localization with NS5, which prompted us to evaluate the interaction between these two nuclear proteins and DENV protein NS5. Through immunofluorescence and biochemical assays, we evaluated the interaction between NS5 and B23 and LMNA/C. Through knockdown assays using a specific siRNA against B23, we saw an effect on the expression of NS5 in infected cells. We also observed a reduction in the viral titer in the presence of B23 siRNA, suggesting that this interaction is important to the formation of the mature viral particle. Through docking assays, we identified an arginine-rich region in the methyl-transferase domain, which could be involved in the interaction with B23, which has been reported to possess a negatively charged region able to bind to positively charged amino acids, like arginine (Lobaina and Perera 2019). The exact mechanism through which NS5 and B23 interact remains an important question, that can help us understand how DENV manipulates the cellular processes that lead to pathogenesis and come up with strategies for the development of drugs against this viral family.

INTRODUCCIÓN

El virus del dengue es la infección arboviral más común en el mundo, provocando aproximadamente 100 millones de infecciones, 500,000 hospitalizaciones y 25,000 muertes cada año en las 2.5 mil millones de personas que viven en zonas tropicales y subtropicales (Figura 1) (Murray, Quam et al. 2013). El virus del dengue es transmitido por mosquitos del género *Aedes*.

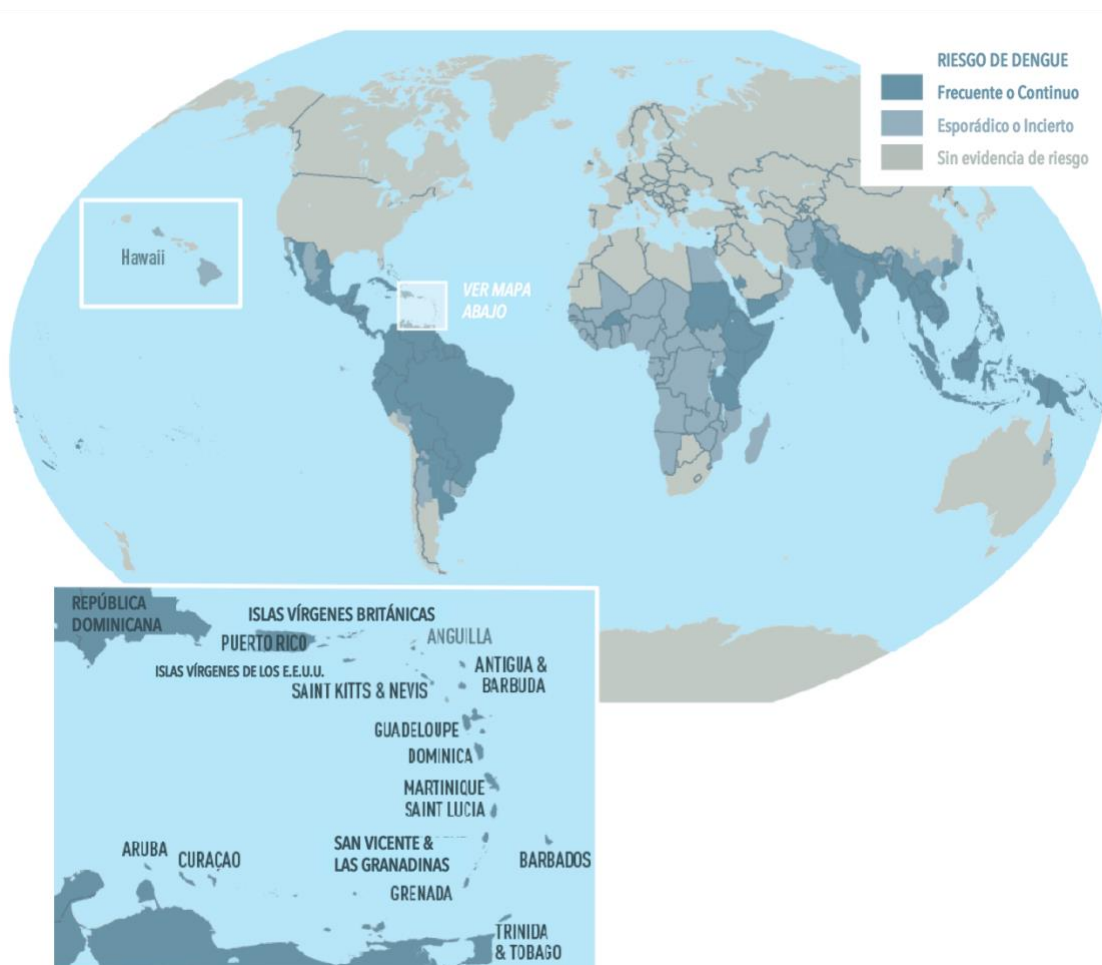


Figura 1. Distribución geográfica de la infección por DENV en 2019

En azul oscuro se esquematizan los países o áreas donde se ha reportado la enfermedad con más frecuencia; en azul claro se observan las áreas con reportes esporádicos; y las zonas sin evidencia de riesgo están marcadas de color gris (Gary W. Brunette 2019).

El virus del dengue pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* dentro de la cual se encuentran el virus del Oeste del Nilo (WNV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus de la encefalitis transmitida por chinche (TBEV), el virus de la fiebre amarilla (YFV) y el virus del Zika (ZIKV). Existen cuatro serotipos del dengue relacionados antigénicamente, conocidos como DENV-1, DENV-2, DENV-3, y DENV-4. La infección con un determinado serotipo induce inmunidad homotípica de por vida, así como inmunidad heterotípica de corta duración contra cualquiera de los otros serotipos. Por lo tanto, una persona que habita áreas endémicas puede adquirir inmunidad contra los cuatro serotipos al infectarse a lo largo de su vida (Murray, Quam et al. 2013).

La enfermedad del dengue se presenta en general como 2 formas clínicas, una benigna denominada fiebre del dengue (DF) y la otra más grave la cual se presenta como dengue hemorrágico o síndrome del choque por dengue (DHF/DSS). Dentro de esta clasificación existe un amplio espectro de formas clínicas desde la más benigna o asintomática hasta la más severa que puede producir la muerte (Geneva 1997).

CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DEL DENGUE

El análisis del virus dengue por microscopía crioelectrónica y cristalografía de rayos X, revela una bicapa lipídica donde se encuentra ubicada la glicoproteína de envoltura, que le confiere al virión una superficie icosaédrica formada por 90 dímeros de la proteína E que forman un revestimiento liso que envuelve la membrana viral (Heinz and Allison 2003) otorgándole al virus una estructura tridimensional (Kuhn, Zhang et al. 2002, Modis, Ogata et al. 2004).

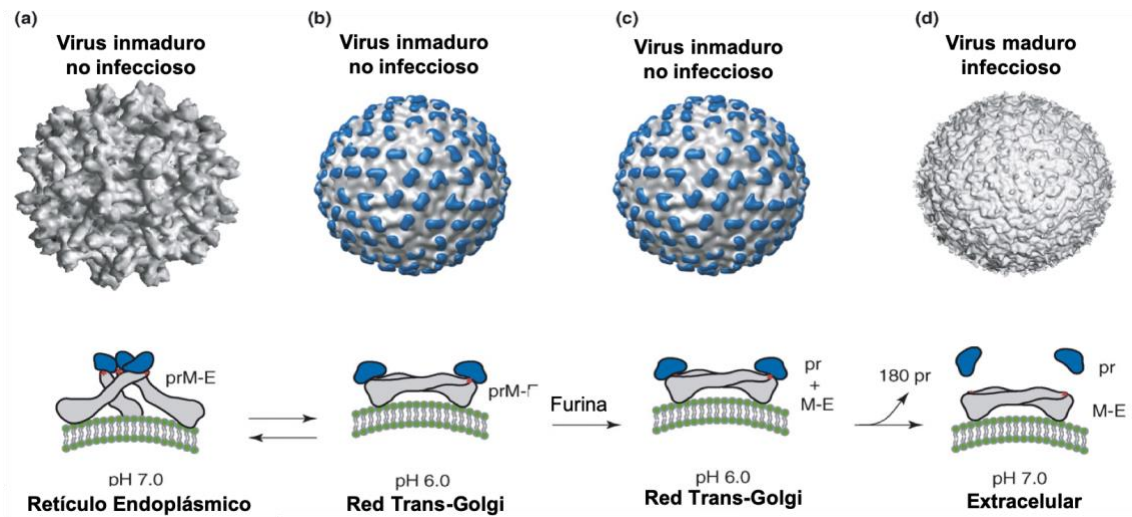


Figura 2. Estructura del virión y conformaciones de la proteína E

La partícula viral inmadura tiene un diámetro de 60 nm, mientras que la partícula madura tiene un diámetro de 50 nm. A) en esta estructura, la proteína E se encuentra formando un heterodímero con prM y esta unión da como resultado 60 espículas triméricas. Este arreglo representa la partícula inicial que se introduce al RE. B) estructura del virión inmaduro durante su tránsito por la TGN. Los heterodímeros de prM-E sufren un cambio conformacional y forman 90 dímeros. C) a lo largo de su paso por la TNG, la prM es escindida por la endoproteasa del huésped furina para dar lugar al péptido pr y a la proteína M. D) después de la escisión de la furina, el virión maduro es secretado al medio extracelular y el péptido pr es liberado de la partícula madura (Perera and Kuhn 2008).

GENOMA VIRAL

El virus del dengue entra a la célula huésped por endocitosis mediada por receptor. Una vez dentro del endosoma, los cambios de pH (6.6) promueven un cambio conformacional de la proteína de envoltura que permite la exposición del péptido fusogénico para que interactúe con la membrana vesicular. Esto da como resultado la liberación del RNA genómico al citoplasma, donde este actúa como un mRNA (Gebhard, Filomatori et al. 2011).

El genoma del virus está constituido por un RNA de cadena sencilla de polaridad positiva de 11 kb de longitud, el cual posee un solo marco de lectura abierta (ORF), que codifica para una sola poliproteína de 3391 aminoácidos. Este RNA posee dos regiones no traducidas UTR en los

extremos 5' y 3' que regulan procesos virales diferentes. En el extremo 5' se encuentra un CAP de tipo I (m⁷GpppAmp) y carece de cola poli A en su extremo 3' (Egloff, Benarroch et al. 2002).

Una vez que inicia la infección, el genoma funciona como mRNA, el cual es traducido inmediatamente y también funciona como molde para la síntesis de más moléculas de RNA.

El 5'UTR de DENV tiene aproximadamente 95-101 nucleótidos de longitud. Contiene dos dominios de RNA, con funciones únicas durante la síntesis de RNA viral. De acuerdo a la secuencia de nucleótidos, se ha establecido que el primer dominio de aproximadamente 70 nucleótidos se pliega formando una estructura tallo de burbuja común en otros miembros del género *Flavivirus* (Funk, Truong et al. 2010).

El segundo dominio del 5'UTR forma una estructura de tallo y burbuja pequeña, el cual contiene secuencias esenciales para la interacción RNA-RNA y la replicación del genoma. Ambos dominios están separados por una secuencia que funciona como espaciador, la cual permite el funcionamiento apropiado de los dos tallos de burbuja. Por otra parte, el 3'UTR tiene 450 nucleótidos de longitud y se encuentra organizado en tres dominios. El dominio I se localiza inmediatamente después del codón de paro y es la región más variable dentro del 3'UTR y entre los 4 serotipos en cuanto a tamaño, oscilando entre 120 nucleótidos a menos de 50 nucleótidos. El dominio II incluye una estructura con forma de mancuerna, la cual está duplicada en tándem. Esta estructura contiene secuencias conservadas en todos los flavivirus transmitidos por mosquito denominadas CS2 y RCS2. Existen secuencias dentro de estos elementos que se cree forman estructuras de pseudonudos, las cuales están involucradas en la traducción de la poliproteína y la síntesis de RNA (Ackermann and Padmanabhan 2001). El dominio III es la región más conservada dentro del 3'UTR. Está formado por un elemento CS1 seguido de una estructura tallo y burbuja terminal. El CS1 contiene una secuencia involucrada en interacciones RNA-RNA entre los extremos del genoma viral. La estructura 3' terminal contiene un tallo y burbuja de 14 nucleótidos seguido de un tallo y burbuja más largo

de 79 nucleótidos (Gebhard, Filomatori et al. 2011).

Una vez traducida, la poliproteína es procesada tanto por proteasas del huésped como por la proteasa viral NS3 para dar origen a tres proteínas estructurales: C, prM y E; y a siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. Las proteínas estructurales forman la estructura del virión, mientras que las no estructurales están involucradas en diferentes eventos de la replicación del RNA viral.

PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO

En el extremo N-terminal de la poliproteína se encuentran las proteínas estructurales y hacia el extremo C-terminal se encuentran las proteínas no estructurales. Se codifican en el siguiente orden: C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5.

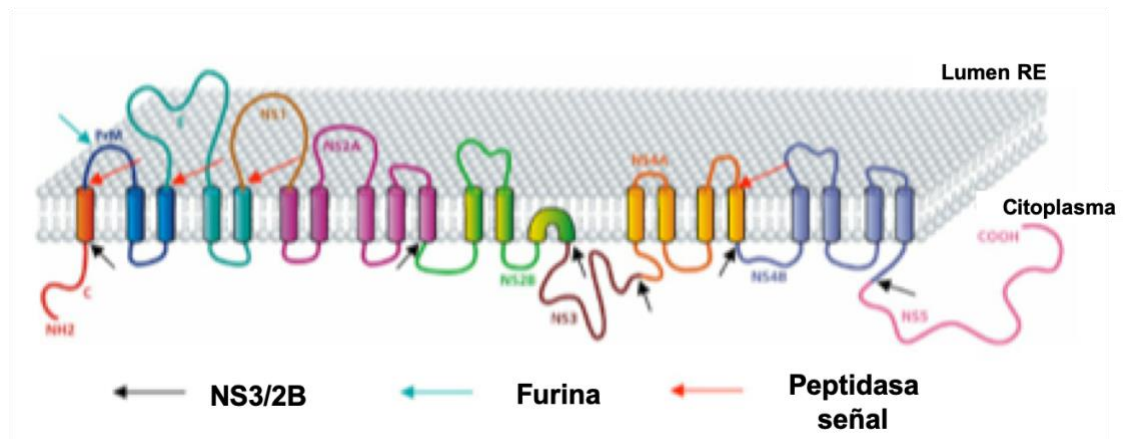


Figura 3. Procesamiento de la poliproteína

Se indican los sitios de escisión de cada una de las proteasas (Perera and Kuhn 2008).

ENSAMBLE Y LIBERACIÓN DE LOS VIRIONES

En el sobrenadante de células infectadas, el virus se encuentra, ya sea como una partícula madura con un diámetro de 50 nm, o como una partícula inmadura con un diámetro de 60 nm. Ambas partículas presentan a la glicoproteína E viral inmersa en una bicapa lipídica proveniente de la célula hospedera. Dentro de esta bicapa se encuentra la nucleoproteína formada por el RNA viral asociado a la proteína de la cápside (C). La

envoltura del virus está constituido por 180 copias de la glicoproteína de envoltura (E) y 180 copias de la proteína de membrana (prM/M). En la partícula inmadura, la proteína E forma 90 heterodímeros que interactúan con las 180 copias de prM/M extendiéndose en la superficie de la partícula como 60 espículas triméricas.

La proteína de la cápside está formada por aminoácidos altamente básicos que interactúan con el RNA viral para formar un precursor de la nucleocápside. La orientación de las proteínas C, prM y E con respecto a la membrana del retículo endoplásmico (ER) sugiere que la nucleocápside adquiere su envoltura al salir del lumen del ER. A través de su paso por la red Trans-Golgi (TGN) el péptido “pr” es escindido por la proteasa del huésped, furina, y la proteína M permanece en la partícula madura como una proteína transmembranal debajo de la envoltura formada por proteínas E. El propéptido pr es liberado al medio cuando el virus sale de la célula como una partícula madura (Perera and Kuhn 2008).

PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

PROTEÍNA E

La proteína de envoltura (E) tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa y es el principal componente estructural del virión. Por lo mismo, esta proteína proporciona el primer punto de contacto entre el virus y la célula huésped. Es una proteína de membrana tipo I, que contiene dominios transmembrana adyacentes en el C-terminal, los cuales funcionan como ancla para unir esta proteína a la membrana y como secuencia señal para la translocación de la proteína NS1. La proteína E contiene 12 residuos de cisteína altamente conservados que forman puentes bisulfuro intermoleculares. No se ha identificado un receptor celular específico para el virus dengue pero existen varias moléculas que se han observado presentan afinidad por el virus, como receptores Fc, glicosaminoglicanos (GAGs) y moléculas asociadas a CD14 de unión a lipopolisacárido.

PROTEÍNA prM

La proteína prM es una proteína pequeña con un peso aproximado de 20 kDa. Esta proteína es de suma importancia para la biogénesis de la partícula viral, ya que es requerida para la prevención de la fusión prematura de la proteína E con los compartimentos acídicos (Yu, Zhang et al. 2008). Como se describió previamente, la proteína prM funciona como una chaperona de la proteína E, facilitando la translocación al lumen del RE, durante la traducción de la poliproteína. Posteriormente, la proteína es dirigida al lumen del RE por una secuencia señal N-terminal inmediatamente río abajo de la proteína NS1 (Falgout, Pethel et al. 1991).

PROTEÍNA DE CÁPSIDE

La proteína de cápside (C) es una proteína relativamente pequeña comparada con el resto de las proteínas flavivirales. Está formada por aproximadamente 100 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 12 kDa. Esta proteína posee afinidad por el RNA viral y por membranas lipídicas. La principal función de esta proteína es formar parte de la nucleocápside conforme se incorpora en los nuevos viriones (Kuhn, Zhang et al. 2002). Esta proteína forma dímeros en solución. Varios estudios han descrito la translocación de la proteína C del citoplasma a la membrana del retículo endoplásmico o su acumulación en gotas de lípidos en el núcleo y nucléolo de las células infectadas. A pesar de su tamaño pequeño, la proteína C posee tres secuencias de localización nuclear (NLS), las cuales son necesarias para su interacción con la importina α para regular su translocación al núcleo de las células infectadas (Sangiambut, Keelapang et al. 2008).

PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

PROTEÍNA NS1

La glicoproteína NS1 de aproximadamente 46 kDa se transloca al lumen del RE y se libera del extremo C-terminal de E por la peptidasa señal. Contiene 12 cisteínas altamente conservadas que forman puentes disulfuro intramoleculares y se glicosila en dos o tres residuos de Asn. NS1 se escinde de NS2A después de su síntesis por una proteasa desconocida del huésped residente del ER. Los ocho residuos hidrofóbicos del C-terminal de NS1 y más de 140 aminoácidos de NS2A son necesarios para esta escisión. Se ha reportado que en células infectadas con DENV, la proteína NS1 es secretada de forma hexamérica (Flamand, Megret et al. 1999). La evidencia sugiere que NS1 está implicada en el proceso de replicación del RNA al unirse al precursor NS4A-2K-4B, pero esta función no se observa con NS4A o NS4B maduras (Plaszczyca, Scaturro et al. 2019).

PROTEÍNAS NS2A y NS2B

NS2A de aproximadamente 22 kDa, es una proteína hidrofóbica de función desconocida pero se cree que está implicada en la replicación (Kummerer and Rice 2002, Leung, Pijlman et al. 2008). La escisión de NS1-2A ocurre en el RE, mientras que el extremo C-terminal se genera a través de la escisión de la unión NS2A-2B por la NS3 indicando que esta proteína debe ser transmembranal (Chambers, McCourt et al. 1989). NS2B es una proteína unida a membrana, de aproximadamente 14 kDa que contiene dos dominios hidrofóbicos que rodean una región hidrofílica conservada. Además, NS2B forma un complejo con NS3 y actúa como cofactor para la función de serín proteasa de NS3 (Falgout, Pethel et al. 1991).

Se ha observado que NS2A de los virus Kunjin (KUNV) y encefalitis

japonesa (JEV), poseen propiedades de viroporina, manifestadas en su habilidad de inducir rearrreglos de membrana y formación de poros (Nemesio and Villalain 2014). Se ha reportado que NS2A de DENV posee un segmento hidrofóbico que interactúa con membranas cargadas negativamente con alto contenido lipídico e induce el rearrreglo de membranas. Esta interacción podría contribuir a las propiedades de viroporina reportadas en modelos de células procariontes y eucariontes (Shrivastava, Garcia-Cordero et al. 2017).

Asimismo se ha reportado que la proteína NS2B de DENV-2 posee la habilidad de formar oligómeros capaces de formar estructuras tipo poro en diferentes estructuras lipídicas, modificando la permeabilidad de membranas celulares (Leon-Juarez, Martinez-Castillo et al. 2016).

PROTEÍNA NS3

NS3 es una proteína citoplásmica de aproximadamente 70 kDa que se asocia con membranas a través de su interacción con la proteína NS2B (Falgout, Pethel et al. 1991, Luo, Xu et al. 2008). NS3 tiene varias actividades enzimáticas que involucran a esta proteína en el procesamiento de la poliproteína y en la replicación de RNA. El N-terminal de NS3 posee homología con serín proteasas parecidas a tripsina. El C-terminal de NS3 está implicado en la replicación del RNA ya que esta región tiene homología con RNA helicasas (Swarbrick, Basavannacharya et al. 2017). Estas enzimas utilizan la energía de la hidrólisis de NTP para desenrollar el RNA. También se ha descrito la actividad de RNA trifosfatasa (RTPasa) de la NS3 involucrada en la formación de la estructura CAP necesaria durante el evento de traducción (Yon, Teramoto et al. 2005).

PROTEÍNAS NS4A y NS4B

NS4A y NS4B de aproximadamente 17 kDa y 27 kDa respectivamente, son proteínas hidrofóbicas asociadas a membrana (Miller, Kastner et al. 2007). Se cree que la proteína NS4A podría participar en la replicación del

RNA (McLean, Wudzinska et al. 2011). NS4B localiza a sitios putativos de replicación del RNA pero también se dispersa a lo largo de las membranas citoplásmicas y probablemente el núcleo. El N-terminal de NS4A se genera por la proteasa NS3/2B mientras que el C-terminal de NS4A contiene un dominio transmembranal que ayuda en la translocación de NS4B al ER. Se ha evaluado el papel de NS4A/B en la evasión de la respuesta inmune por parte del virus y se encontró que ambas proteínas son capaces de inhibir la vía de señalización de interferón (Munoz-Jordan, Sanchez-Burgos et al. 2003, Munoz-Jordan, Laurent-Rolle et al. 2005, Morrison, Aguirre et al. 2012).

PROTEÍNA NS5

La proteína NS5 es la más grande y mejor conservada entre los miembros de la familia flavivirus. Esta proteína posee aproximadamente 900 aminoácidos y tiene un peso aproximado de 105 kDa. Esta proteína se origina por la escisión entre NS4B y NS5 a través del complejo NS3/2B. NS5 juega un papel importante en la replicación viral ya que contiene actividades enzimáticas requeridas para la formación del CAP viral y para la síntesis del RNA viral. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS5 sugirió que en el extremo N-terminal se encuentra un dominio de metiltransferasa (MTasa) dependiente de S-adenosil-L-metionina (SAM) (Koonin 1993), y en el extremo C-terminal existe un dominio de polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp) (Koonin 1991). Se ha observado que el dominio N-terminal tiene la habilidad de unirse a GTP y de realizar reacciones de metilación bioquímicamente distintas (metilación de N-7 y 2'-O) requeridas para la formación del CAP de RNA (Egloff, Benarroch et al. 2002) (Ray, Shah et al. 2006).

Además de su papel en el complejo de replicación viral, estudios recientes han demostrado que la proteína NS5 también juega un papel en la patogénesis. NS5 no solo se encuentra asociada al complejo replicativo sino también es posible encontrarla libre en el citoplasma y en el caso de algunos flavivirus, también en el núcleo, donde interactúa con factores del huésped (Hannemann, Sung et al. 2013).

La proteína NS5 de algunos flavivirus también puede interferir con la señalización de interferón y con la producción de citocinas (Best, Morris et al. 2005, Medin, Fitzgerald et al. 2005, Ashour, Laurent-Rolle et al. 2009). Se sabe que la proteína NS5 es blanco de fosforilación pero el mecanismo aún no está descrito (Kapoor, Zhang et al. 1995, Bhattacharya, Hoover et al. 2008).

DOMINIO DE METILTRANSFERASA DE NS5

De los tres dominios que forman a la proteína NS5, MTasa, SAM y el

dominio RNA RdRp, el dominio de MTasa es el más pequeño, y está formado por 300 aminoácidos. Este dominio, a su vez, está constituido por tres subdominios, un subdominio N-terminal, un subdominio llamado core o núcleo, y un subdominio C-terminal. Tiene tres sitios clave: el sitio de unión a GTP en el subdominio N-terminal; el sitio de unión a RNA y el sitio de unión a S-adenosil-metionina (SAM) en el subdominio core. La función del subdominio C-terminal aún no ha sido elucidado. La principal función del dominio de MTasa es formar y unir el cap en el extremo 5' del genoma viral. El dominio de MTasa es responsable de tres funciones de la proteína NS5, guanililtransferasa (GTasa), N7 MTasa y 2-O MTasa (Zhou, Ray et al. 2007, Issur, Geiss et al. 2009).

Formación del CAP viral

El mRNA de los flavivirus contiene un “cap” de guanosina unido covalentemente al extremo 5'. La formación de esta estructura requiere de tres reacciones enzimáticas secuenciales:

- La enzima RNA trifosfatasa hidroliza el fosfato gamma del trifosfato 5' terminal del RNA naciente para dar lugar a un difosfato.
- La enzima guanililtransferasa promueve la unión de una molécula de GMP al difosfato 5' terminal resultando en una unión trifosfato 5'-5'.
- La enzima N7 metiltransferasa transfiere un grupo metilo a la guanosina en la posición N7 del RNA naciente.

Todos estos pasos se requieren para formar una estructura “cap” tipo 0 (m^7GpppN) (Figura 5). La estructura core del cap contribuye a proteger al RNA naciente desactivar la respuesta inmune innata del hospedero. Los nucleótidos adyacentes a la estructura cap pueden ser metiladas por una 2'-O-metiltransferasa (2'-O-MTasa) para dar lugar a estructuras cap tipo I ($m^7GpppNm$) o tipo II ($m^7GpppNmNm$). La actividad de N7 MTasa es necesaria para la traducción del RNA viral y la actividad de 2-O MTasa asemeja el mRNA celular y así evade la detección de la respuesta inmune innata del huésped. Ambas reacciones de metilación se llevan a cabo en

presencia de S-adenosil-L metionina (SAM) como el donador del grupo metil (Liu, Dong et al. 2010).

Los flavivirus transmitidos por vector poseen estructuras cap tipo I idénticas ($m^7GpppAmG$). Un dato que corrobora esto es que los primeros dos nucleótidos (AG) del genoma están estrictamente conservados.

La formación del cap en los flavivirus involucra a la proteína NS3 por su actividad de trifosfatasa de RNA (Bartelma and Padmanabhan 2002, Benarroch, Selisko et al. 2004) y a la proteína NS5 porque tiene funciones de metiltransferasa tanto de N7 como de 2'-O. También se ha descrito su función de guanililtransferasa (Issur, Geiss et al. 2009).

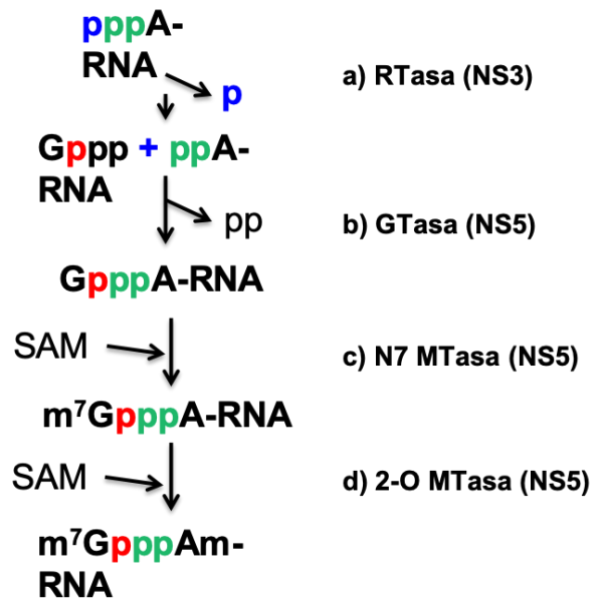


Figura 4. Formación del cap viral

La enzima RNA trifosfatasa (NS3) hidroliza el fosfato gamma del trifosfato 5' terminal del RNA naciente para dar lugar a un difosfato. La enzima guanililtransferasa promueve la unión de una molécula de GMP al difosfato 5' terminal resultando en una unión trifosfato 5'-5'. La enzima N7 metiltransferasa transfiere un grupo metilo a la guanosina en la posición N7 del RNA naciente. Todos estos pasos se requieren para formar una estructura "cap" tipo 0 (m^7GpppN).

Actividad enzimática

Al analizar la secuencia de la proteína NS5 se identificó una región conservada en MTasas dependientes de SAM en el dominio N-terminal; este hallazgo permitió sugerir que esta proteína podría poseer función de

MTasa (Koonin 1993). Al utilizar sustratos de RNA con cap (GpppAC₅ y m⁷GpppAC₅) y sin cap (pppAc₅), en presencia de una MTasa de DENV-2 expresada en un sistema bacteriano se demostró que esta MTasa tiene actividad de 2'-O-MTasa dependiente de cap. Adicionalmente en 2006, Ray y colaboradores demostraron la actividad de N7-MTasa (Ray, Shah et al. 2006). La actividad de MTasa no se ha podido detectar al utilizar un sustrato de RNA que no pertenezca a DENV, demostrando que ambas actividades de MTasa dependen de la presencia de secuencias específicas del genoma de los flavivirus . Al evaluar los dominios de MTasa de las proteínas NS5 de DENV-1, DENV-2 y YFV se encontró que todas estas proteínas tienen actividad de N7 y 2'-O-MTasa (Dong, Ray et al. 2007, Zhou, Ray et al. 2007, Kroschewski, Lim et al. 2008). Análisis de cross-linking y polarización de fluorescencia mostraron que el dominio de MTasa de la proteína NS5 tiene sitios de unión a GTP de alta afinidad (Issur, Geiss et al. 2009). Ensayos de cristalografía realizados en presencia de GTP, revelan que la MTasa de los flavivirus puede unirse a GTP y sugieren un posible sitio para la formación del complejo GMP-enzima (Egloff, Decroly et al. 2007). En 2009, Issur y colaboradores demostraron que NS5 puede utilizar a GTP como sustrato para formar un intermediario GMP-enzima y que la presencia de la proteína NS3 estimula la formación de este complejo. Observaron que GMP puede ser transferido de NS5 al extremo difosfatado del sustrato de RNA aceptor sin necesidad de especificidad al utilizar un sustrato de RNA sintético irrelevante, es decir, no relacionado con el genoma de los flavivirus (Issur, Geiss et al. 2009). Estos datos demuestran que en efecto, la proteína NS5 presenta actividad de GTasa y que esta función no requiere secuencias específicas del genoma de los flavivirus. Al analizar la cinética de la metilación del sustrato de RNA (GpppA-RNA) por las MTasas de WNV, DENV-1 y YFV se detectó la guanina final metilada en N7 (m⁷GpppA-RNA). El producto metilado en 2'O (m⁷GpppAm-RNA) solo se detectó una vez que el sustrato metilado en N7 se había acumulado sugiriendo que el evento de metilación del cap de los flavivirus se lleva a cabo en el siguiente orden: GpppA-RNA > m⁷GpppA-RNA > m⁷GpppAm-RNA (Ray, Shah et al. 2006, Zhou, Ray et al. 2007).

Estructura del dominio de MTasa

La estructura del dominio de MTasa de la proteína NS5 de DENV-2 (formada por los aminoácidos 1-296) fue la primera MTasa en determinarse por cristalografía de rayos X (Egloff, Benarroch et al. 2002). Un análisis comparativo de las MTasas de los diferentes miembros de la familia *Flaviviridae* mostró que hay un alto grado de homología entre ellas (Koonin 1991). Estructuralmente, la MTasa de los flavivirus contiene tres subdominios, un subdominio N-terminal, un núcleo y un subdominio C-terminal (Fig. 5). El primer subdominio contiene un sitio de unión a GTP que permite la interacción directa con la guanosina de la estructura cap. El núcleo de la MTasa es el responsable de la actividad catalítica y contiene un único sitio de unión a S-adenosil-L-metionina (SAM). Este subdominio está unido al sitio de unión a GTP a través de una región de aminoácidos cargados positivamente que podrían interactuar con el RNA viral. Hasta la fecha se desconoce la función del subdominio C-terminal de la MTasa (Davidson 2009).

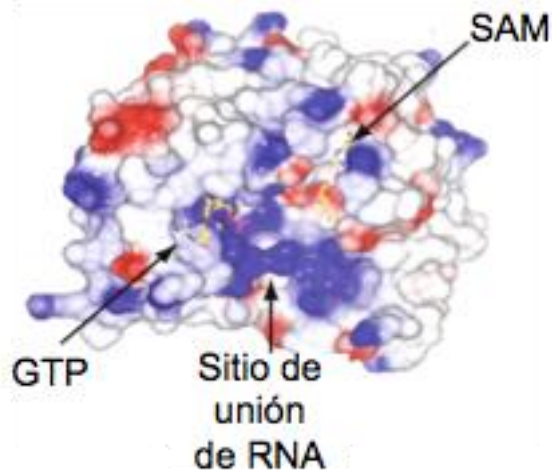


Figura 5. Estructura de la MTasa de NS5

Se muestra el sitio de unión de GTP, el sitio de unión de RNA y el sitio de unión de SAM. Cabe señalar que existe un solo sitio de unión de SAM a pesar de que la proteína NS5 lleva a cabo dos eventos de metilación (Davidson 2009).

El subdominio del núcleo de la MTasa (aminoácidos 55-222) está

compuesto de siete hojas plegadas β rodeadas de cuatro hélices α . El plegamiento de este subdominio tiene un gran parecido con otras MTasas dependientes de SAM ya caracterizadas en otros modelos. Un análisis comparativo de la estructura de MTasas de DNA llevó a la identificación de nueve aminoácidos conservados, los cuales están involucrados en la unión a SAM (Malone, Blumenthal et al. 1995). Al comparar la secuencia de la MTasa de DENV-2 con otras MTasas virales, se encontró que ocho de los nueve aminoácidos conservados están posicionados en la secuencia de MTasa (Egloff, Benarroch et al. 2002). La mayor homología fue encontrada en el motivo I, correspondiente al sitio de unión a SAM. La presencia de esta secuencia en la proteína NS5 llevó a la conclusión de que NS5 posee actividad de MTasa (Koonin 1991). Adicionalmente se identificaron cuatro residuos en los sitios activos putativos (K-61, N-146, K-181, Q-217), los cuales son indispensables para la actividad catalítica de 2'O-MTasa en las regiones que corresponden a los motivos X, IV, VI y VIII.

La estructura del sitio de unión a SAM es la característica mejor conservada entre las MTasas, aunque los residuos involucrados pueden variar, con excepción de los residuos presentes en los motivos I y II, los cuales están altamente conservados (Martin and McMillan 2002). La unión de SAM a la MTasa se estabiliza a través de una red de enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals con residuos específicos. Así, el anillo de adenosina se acomoda en el compartimiento hidrofóbico conformado por las cadenas laterales de los residuos T-104, K-105, V-132 e I-147 y es estabilizado por enlaces de hidrógeno de los residuos K-105, N-131 y V-132. Estos residuos están altamente conservados entre los flavivirus, excepto por K-105, el cual varía entre virus transmitidos por mosquito o por garrapata. En contraste con el anillo de adenosina, la ribosa de SAM se une de manera distinta a las diferentes estructuras de MTasa de los flavivirus. Los grupos hidroxilo de los sitios 2' y 3' de la ribosa de SAM forman enlaces de hidrógeno con H-110 y Q-111. El resto de la molécula de SAM se estabiliza por enlaces de hidrógeno con S-56, G-86 y W-87. Estos residuos están conservados entre las MTasas de los flavivirus (Egloff, Decroly et al. 2007).

Subdominio N-terminal

A través de estudios de unión de GTP, se identificó un subdominio con un sitio de unión a GTP en una región del subdominio de núcleo de la MTasa (Egloff, Benarroch et al. 2002). A partir de este descubrimiento, se determinaron las estructuras del dominio de MTasa de DENV-2 en complejo con el análogo de GTP, trifosfato de ribavirina (Benarroch, Egloff et al. 2004) y los análogos de cap GpppA, m⁷GpppA, GpppG, m⁷GpppG, m⁷GpppGm (Egloff, Decroly et al. 2007). Estos estudios han definido el compartimiento de unión a GTP y los contactos que se forman con el anillo de guanina, la ribosa y α -fosfato. El anillo de guanina se estabiliza al unirse con el anillo aromático de F-25 e interacciones electrostáticas entre el grupo amino de la guanina y los residuos L-17, N-18 y L-20. Los contactos limitados con la guanina permiten la unión de GTP metilado y no metilado con la misma especificidad. Por otra parte, la especificidad por ribonucleótidos es determinada por la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa con K-14 y N-18 y el grupo hidroxilo en la posición 3' con K-14 y S-151. Tanto K-14 como N-18 están conservados entre los flavivirus.

El sitio de unión a GTP se localiza aproximadamente a 12-13 Å de distancia del sitio de unión de SAM. Cuando se analizaron modelos estructurales de la MTasa en complejo con RNA pequeños con estructura cap en su extremo 5' que presentan una conformación apropiada para una metilación en la posición 2'-O, sugieren que un máximo de cinco nucleótidos después de la adenosina podrían acomodarse en el espacio de 57 aminoácidos cargados positivamente (Egloff, Decroly et al. 2007).

DOMINIO DE RdRp

El dominio de polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp) se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína NS5 y está conformada por 600 aminoácidos, altamente conservado entre los flavivirus debido a su papel crítico en la replicación del RNA viral. Este dominio posee una conformación de RdRp convencional con la forma de una mano derecha cerrada y tres subdominios que forman los dedos, el pulgar y la palma. El subdominio de la palma es el mejor conservado de los tres debido a que posee el sitio catalítico de la enzima. Los subdominios de los dedos y el pulgar forman un túnel a través del cual el RNA entra en contacto con el subdominio de la palma.

Síntesis de RNA viral

La unión directa de la polimerasa NS5 a la estructura de tallo de burbuja en el extremo 5'UTR es indispensable para la síntesis del RNA viral. El modelo actual sugiere que la proteína NS5 se une al extremo 5' y que ocurre una circularización del genoma que permite la unión de la polimerasa NS5 al extremo 3' donde se inicia la síntesis de RNA (Filomatori, Lodeiro et al. 2006). En células infectadas con flavivirus, la síntesis de RNA viral ocurre en la región perinuclear del citoplasma en asociación con membranas del RE (Bartenschlager and Miller 2008). Se han detectado tres especies de RNA en células infectadas: una cadena sencilla de RNA de 40-44 S, una forma replicativa de doble cadena de 20-22 S y un intermediario replicativo de 20-28 S. Al analizar la cinética de síntesis de las especies de RNA viral se concluye que en una infección tardía la cadena positiva del genoma de RNA se replica asimétricamente de manera semiconservativa utilizando una cadena negativa como molde. La síntesis de RNA de cadena negativa ocurre continuamente a lo largo de la infección. Así, la proporción de cadenas de RNA positivas a negativas se eleva a un nivel de aproximadamente 10:1 en una infección tardía. La actividad de RdRp se demostró al incorporar nucleótidos marcados radioactivamente a las especies de RNA viral endógeno. Se utilizaron UMP marcados con fósforo

32 (^{32}P) en presencia de hebras de RNA cuyas secuencias 3' eran idénticas a las del genoma viral. La incorporación de [^{32}P]UMP a las hebras de RNA recién sintetizadas aumentó en un período de 4 horas. El análisis comparativo de la secuencia de varios flavivirus mostró que la región C-terminal de NS5 contenía motivos conservados en otras proteínas virales con actividad de RdRp, sugiriendo que NS5 era la RdRp viral (Koonin 1991, Ackermann and Padmanabhan 2001). Además, se encontró que el tratamiento con anticuerpos específicos contra NS3 y NS5 de DENV-2 y JEV inhibieron la síntesis de RNA en ensayos de RdRp in vitro, confirmando así el papel de NS3 y NS5 en la replicación viral (Bartholomeusz and Wright 1993). La actividad de RdRp de NS5 en ausencia de otros componentes virales o de la células huésped se demostró usando NS5 de DENV-1 expresada en un sistema bacteriano (Tan, Fu et al. 1996). Esta proteína fue capaz de utilizar moldes correspondientes al extremo 3' del genoma de DENV-1 o un RNA no viral en combinación con un primer específico para sintetizar productos de polaridad negativa. Más tarde se demostró que la proteína recombinante NS5 del DENV-2 expresada en un sistema bacteriano es capaz de sintetizar RNA y se confirmó que la RdRp de los flavivirus es molde-específica y puede iniciar síntesis de RNA de cadena negativa de novo (Ackermann and Padmanabhan 2001, Ferrer-Orta, Arias et al. 2006, Bartenschlager and Miller 2008).

Estructura

Las estructuras de las RdRp de WNV y DENV-3 revelaron que tienen una forma casi esférica y adoptan una conformación típica de estructuras de RdRp ya caracterizadas que se asemejan a una mano derecha cerrada con subdominios que se han denominado “dedos”, “palma” y “pulgar” (Fig. 6). En la figura se pueden observar dos túneles que corren de manera perpendicular uno del otro. Uno de los túneles se localiza en la interfaz entre los dedos y el pulgar y se cree que permite el acceso del molde de ssRNA al sitio activo del dominio de la palma. Un segundo túnel intersecta en el sitio activo permitiendo la entrada de dNTPs (Yap, Xu et al. 2007,

Davidson 2009).

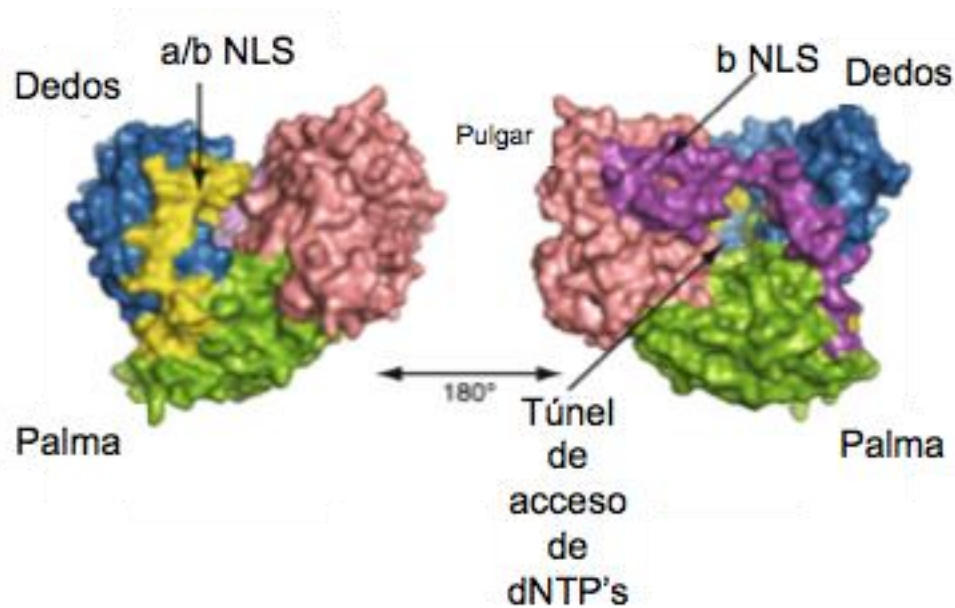


Figura 6. Estructura de la RdRp de NS5

Se muestran los subdominios de los dedos, la palma y el pulgar. Se observa que los sitios de localización nuclear (NLS) β y α/β se encuentran en el subdominio de los dedos (Davidson 2009).

El subdominio de la palma

El subdominio de la palma es el mejor conservado entre las estructuras de RdRp ya que contiene el sitio activo. Cuatro de los seis motivos conservados que definen las RdRp están localizados en el dominio de la palma y los residuos dentro de estos motivos están involucrados en la unión de iones metálicos, nucleótidos y RNA.

La hoja plegada β de la RdRp de los flavivirus consiste de solo dos hebras β ($\beta 4$ y $\beta 5$) rodeadas por ocho hélices α (Yap, Xu et al. 2007). Los residuos G-N-N del sitio activo están localizados en una vuelta entre las hebras $\beta 4$ y $\beta 5$. Al poner los cristales de RdRp de DENV-3 y WNV en contacto con $MgCl_2$ resultó en la unión de un ion de Mg a la N-533 y a la N-664 en una conformación no-catalítica. No se ha descrito la función este metal no catalítico pero se ha sugerido que podría participar en el inicio de la síntesis de RNA (Benarroch, Selisko et al. 2004).

El subdominio de los dedos

Este subdominio forma un túnel que guía el molde de RNA al sitio activo. Contiene un dominio nuclear que interconecta con el subdominio del pulgar para delimitar el sitio activo (Bressanelli, Tomei et al. 1999). Este subdominio también contiene una región que presenta secuencias de localización nuclear llamadas β NLS y α/β NLS (Forwood, Brooks et al. 1999, Brooks, Johansson et al. 2002).

El subdominio del pulgar

Los 187 aminoácidos del extremo C-terminal de la RdRp constituyen el subdominio del pulgar, el más diverso entre las estructuras de la RdRp. Este subdominio es grande en los flavivirus comparado con otros virus cuya RdRp requiere iniciadores para sintetizar RNA. El subdominio de pulgar de RdRp que inician síntesis de RNA de novo posee dos características que los distinguen de aquellas RdRp dependientes de iniciadores: tienen un loop característico que forma una plataforma para estabilizar el complejo de iniciación de RNA y regiones en el extremo C-terminal que abarcan el sitio activo para regular la síntesis de RNA (Lesburg, Cable et al. 1999).

FOSFORILACIÓN DE NS5

La fosforilación puede regular diversas funciones de las proteínas tales como actividad enzimática, estabilidad, localización subcelular y unión con otras proteínas (Jakubiec and Jupin 2007). Kapoor y colaboradores describieron múltiples formas de NS5 debido a sus diferentes estados de fosforilación. La forma hiperfosforilada se localiza predominantemente en el núcleo y la forma hipofosforilada en el citoplasma donde se asocia a la proteína NS3; este dato sugiere que la diferencia en los estados de fosforilación de NS5 podría estar regulando o condicionando la interacción entre NS3 y NS5, y por lo tanto su papel como componente del complejo de

replicación (Kapoor, Zhang et al. 1995). Interesantemente, se encontró que la misma región de NS5 que interactúa con NS3, también interactúa con el receptor nuclear importina β , sugiriendo que tanto NS3 como la importina compiten por el sitio de interacción con NS5 (Johansson, Brooks et al. 2001). De acuerdo a un modelo propuesto por Kapoor, sugiere que una quinasa celular podría provocar la disociación del complejo NS3-NS5 para promover la translocación de NS5 al núcleo para llevar a cabo una función aún desconocida (Kapoor, Zhang et al. 1995). No se conocen las quinasas involucradas en la fosforilación de NS5 ni el mecanismo por el cual NS5 hiperfosforilada se transloca al núcleo pero se ha sugerido la actividad de la quinasa de caseína I (Quintavalle, Sambucini et al. 2007).

INTERACCIONES DE NS5

Ya se ha establecido que la interacción entre las proteínas NS3 y NS5, es indispensable para la replicación de DENV (Kapoor, Zhang et al. 1995, Yon, Teramoto et al. 2005, Issur, Geiss et al. 2009). Adicional a esto, existe evidencia que sugiere que NS5 interactúa con proteínas de la célula huésped en varias etapas del ciclo viral. Experimentos de crosslinking utilizando transcritos de RNA de las regiones traducibles 5' y 3' de DENV-4 y lisados de monocitos U937 infectados, identificaron siete proteínas que interactúan con estas regiones; una de estas proteínas fue la proteína La (Garcia-Montalvo, Medina et al. 2004, Yocupicio-Monroy, Padmanabhan et al. 2007). Se encontró que una proteína La recombinante inhibe la actividad de RdRp de NS5 de manera dosis-dependiente, sugiriendo que La podría jugar un papel en la regulación de las cadenas positivas y negativas del virus del dengue (Yocupicio-Monroy, Padmanabhan et al. 2007). Debido a que NS5 es blanco de fosforilación, probablemente esta proteína podría estar interactuando con proteínas del huésped involucradas en su fosforilación/desfosforilación (Kapoor, Zhang et al. 1995, Quintavalle, Sambucini et al. 2007). Además, la proteína NS5 se ha encontrado tanto en citoplasma como en núcleo por lo que debe estar formando interacciones con proteínas necesarias para su importe nuclear (Forwood, Brooks et al.

1999, Johansson, Brooks et al. 2001, Uchil, Kumar et al. 2006). Por otra parte, se ha reportado que la proteína NS5 inhibe la vía de interferón al bloquear, ya sea la fosforilación de STAT2 o promoviendo su degradación vía proteosoma, y se ha establecido que esta interacción es directa (Ashour, Laurent-Rolle et al. 2009, Mazzon, Jones et al. 2009). Recientemente se reportó que NS5 suprime la respuesta de interferón al inhibir el reclutamiento de PAF1C, un complejo de asociación a cromatina que promueve varios eventos claves necesarios para la elongación transcripcional. Este hallazgo se dio a través de ensayos de espectrometría de masas con DENV y ZIKV en dos huéspedes, humano y mosquito (Shah, Link et al. 2018). El que la proteína NS5 se encuentre mayoritariamente en el núcleo, siendo una proteína cuya función principal es en citoplasma, hace indispensable el estudio de las implicaciones de su localización nuclear. Utilizando un análisis de doble híbrido se identificaron 139 proteínas con las cuales la proteína NS5 interactúa. De estas, se encontraron 105 proteínas hepáticas humanas y fragmentos de ocho proteínas de DENV-2. Al hacer un knockdown de algunas de estas proteínas humanas, se observó inhibición en la replicación de un replicón, sugiriendo que estos factores del huésped podrían ser importantes para el ciclo replicativo del virus (Khadka, Vangeloff et al. 2011). En otro trabajo, se identificaron interacciones de la proteína NS5 con 49 proteínas del vector y 11 proteínas humanas, de acuerdo al análisis de doble híbrido (Mairiang, Zhang et al. 2013). Más tarde, Le Breton y colaboradores, en un análisis diferente de doble híbrido identificaron interacciones entre 108 proteínas humanas y las proteínas NS3 y NS5 de DENV-2 (Le Breton, Meyniel-Schicklin et al. 2011). Se ha reportado que la proteína NS5 colocaliza con la proteína nuclear lamina A (Uchil, Kumar et al. 2006, Khadka, Vangeloff et al. 2011), la cual se ha descrito que regula la transcripción de algunos genes, sugiriendo un papel de la NS5 en la regulación transcripcional (Dreuillet, Tillit et al. 2002). Se han reportado proteínas de flavivirus que ingresan al núcleo de células infectadas debido a que tienen secuencias de localización nuclear y que interactúan con proteínas nucleares y/o nucleolares. Este es el caso de la proteína de la cápside del virus West Nile (WNV), virus Kunjin (KUN), virus

de encefalitis japonesa (JEV) y DENV, pero en el caso de las proteínas de la cápside de DENV y KUN, no se ha demostrado su interacción con alguna proteína celular (Westaway, Khromykh et al. 1997, Tsuda, Mori et al. 2006, Yang, Lee et al. 2008, Colpitts, Barthel et al. 2011). Se ha reportado interacción entre la proteína de la cápside de WNV con la proteína B23, una proteína nucleolar involucrada en el procesamiento y ensamblaje del rRNA (Yang, Lee et al. 2008). Esta misma proteína fue encontrada también en otro interactoma de la proteína NS5 publicado recientemente (De Maio, Risso et al. 2016).

Recientemente se sugirió el uso de inhibidores del tráfico nucleocitoplásmico de NS5 como terapia antiviral. Al conocerse las proteínas transportadoras involucradas en la importación y exportación de NS5 del núcleo, se desarrollaron inhibidores contra NS5 de los cuatro serotipos de DENV, al igual que de WNV y ZIKV, sugiriendo una estrategia promisoriosa para combatir a estos flavivirus (Jans and Martin 2018).

LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NS5

La proteína NS5 de la mayoría de los flavivirus se ha detectado en el núcleo de células infectadas a través de ensayos de inmunofluorescencia, con la excepción de los virus West Nile, Kunjin y Sarafend (Westaway, Mackenzie et al. 2002, Mackenzie, Kenney et al. 2007) en donde la proteína NS5 no se transloca al núcleo. Se describió una diferencia en la localización nuclear de NS5 de los cuatro serotipos de DENV (Hannemann, Sung et al. 2013, Tay, Fraser et al. 2013). Ambos trabajos muestran que la localización de NS5 en DENV-2 y DENV-3 es nuclear y en menor proporción citoplásmica; sin embargo NS5 de DENV-1 y DENV-4 es estrictamente citoplásmica. En la mayoría de las células infectadas con DENV-2 la proteína NS5 se localiza en el núcleo, observándose un 80-90 % de acumulación nuclear. Aproximadamente un 70-80 % de las células infectadas presentan

localización nuclear de NS5. Estudios de inmunocolocalización han mostrado que durante una infección con DENV-2, la proteína NS5 puede detectarse en el núcleo de un gran número de células de mamífero (Uchil, Kumar et al. 2006, Kumar, Buhler et al. 2013). En células Vero y BHK-21, se puede detectar la localización nuclear de NS5 a partir de las 14-16 horas posinfección y aumenta conforme la infección progresa. Después de que se describió que la proteína NS5 de DENV-2 podía ser detectada en el núcleo de células infectadas (Kapoor, Zhang et al. 1995), se identificaron secuencias de localización nuclear (NLS). En la vía canónica de importe la región de NLS, el cual está cargado positivamente y es reconocido por la importina α , funcionando como un adaptador para unir a la proteína cargo con la importina β de manera indirecta. Las proteínas se translocan a través del complejo de poro nuclear. La unión de Ran-GTP a la importina β de lado nucleoplásmico del poro resulta en la disociación del complejo y liberación de la proteína cargo dentro del núcleo. Normalmente, los NLS reconocidos por la importina α contienen, ya sea un grupo de aminoácidos básicos (NLS monopartita) o dos grupos de aminoácidos básicos separados por aproximadamente 10-12 aminoácidos (NLS bipartita). Al analizar la secuencia de NS5 se identificaron tres grupos de aminoácidos básicos (K-371/372, K-388/389/390, y R-401/K-402) que se asemejaban a uno o más NLS bipartitas (Forwood, Brooks et al. 1999). Al fusionar esta región de 37 aminoácidos a β -galactosidasa (NS5-NLS- β -gal), se observó localización nuclear de β -galactosidasa confirmando que NS5 de DENV poseía un NLS funcional. Al hacer un ensayo de ELISA con un heterodímero de importina α/β de ratón, NS5-NLS- β -gal se unió con alta afinidad sugiriendo que el transporte nuclear era dependiente de la vía convencional de importe. Se encontró un segundo NLS funcional adyacente al α/β NLS al identificar una interacción entre los aminoácidos 320-368 de NS5 de DENV-2 (β NLS) y la importina β 1 (Johansson, Brooks et al. 2001). También se encontró que la región C-terminal de la proteína NS3 interactúa con los aminoácidos 320-368 de la proteína NS5 compitiendo con la importina β . A pesar de que β /NLS y α/β NLS son funcionales de manera individual, al diseñar una proteína fusionada a β -gal que contenía ambas secuencias, se observó una

reducción en la acumulación nuclear, sugiriendo que en el contexto de la proteína NS5 completa, la función de los NLS podría estar regulada por la conformación o interacción con otras moléculas.

Debido a que la proteína NS5 lleva a cabo su principal función de polimerasa viral en el citoplasma, se investigó la presencia de una secuencia de exportación nuclear (NES) que permitiera a la NS5 salir del núcleo. Los NES son secuencias ricas en leucina y al comparar las secuencias de los 4 serotipos de DENV se encontró que todos poseen regiones ricas en leucina por lo que es posible la existencia de NES funcionales. A través de un análisis *in silico*, se observó que NS5 es capaz de interactuar con la exportina CRM-1 y para confirmar esta interacción se utilizó a la leptomicina B, un inhibidor de la CRM-1, para observar diferencias en la localización de NS5. En presencia de leptomicina B, se observó mayor concentración de NS5 en el núcleo, por lo que se concluyó que NS5 posee una secuencia de exportación nuclear y que esta exportación es dependiente de la exportina CRM-1. En este trabajo se encontró además, que la acumulación de NS5 en el núcleo de células infectadas es crucial para la replicación viral y la regulación de IL-8 (Rawlinson, Pryor et al. 2009). Sin embargo, en 2013, Kumar y colaboradores mutaron los sitios de localización nuclear, evitando así la translocación de NS5 al núcleo y no observaron una correlación clara de la acumulación de NS5 en citoplasma con la replicación de DENV o la regulación de IL-8 (Kumar, Buhler et al. 2013). El hecho de que no todos los flavivirus presentan localización nuclear de NS5 podría ser un indicio de que la forma nuclear de la proteína NS5 no es necesaria para la replicación.

Utilizando dos serotipos con diferente localización nuclear de NS5 (DENV-1 y DENV-2), recientemente se reportó que 18 aminoácidos presentes en la región C-terminal de NS5 regulan la localización subcelular. Al intercambiar regiones entre NS5 de DENV-1 y DENV-2, se identificaron 18 residuos en el extremo C-terminal que son suficientes para redireccionar a NS5 del citoplasma al núcleo (Tay, Smith et al. 2016).

Se ha descrito que DENV provoca una desregulación en la secreción de IL-8 (Raghupathy, Chaturvedi et al. 1998, Bosch, Xhaja et al. 2002). Mutaciones en el α/β NLS provocaron una alteración en la expresión de IL-8, lo que da indicios de una interacción de NS5 con algún factor nuclear (Medin, Fitzgerald et al. 2005).

VIRUS DE RNA Y SU INTERACCIÓN CON EL NUCLÉOLO

Los virus han evolucionado para utilizar la maquinaria celular a su favor. Los virus de DNA ingresan al núcleo para replicar su genoma utilizando los componentes nucleares de la célula. En el caso de la mayoría de los virus de RNA, la replicación se lleva a cabo en el citoplasma y su interacción con el núcleo no es algo esperado. Sin embargo, se ha observado que algunas proteínas de virus de RNA en efecto ingresan al núcleo, no para llevar a cabo la replicación de su genoma, si no para otros propósitos en beneficio del virus, como la inhibición de la respuesta inmune, inhibición de la apoptosis o la regulación del ciclo celular.

De manera interesante, se han reportado algunas proteínas de virus de RNA que también forman interacciones con el nucléolo.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL NUCLÉOLO

El nucléolo es una estructura altamente dinámica a la que se le han atribuido varias funciones a lo largo de 50 años, desde que se descubrió su papel en la biogénesis de ribosomas.

El nucléolo está ensamblado alrededor de cromosomas específicos. En el caso de los humanos, estos cromosomas son 13, 14, 15, 21 y 22, los cuales contienen repetidos de DNA llamados regiones organizadoras nucleolares

(NORs), alrededor de las cuales se forma el nucléolo.

El nucléolo no posee una membrana pero se han identificado 3 principales componentes dentro de él: el centro fibrilar (FC), el componente denso fibrilar (DFC) y el componente granular (GC). Los ribosomas son ensamblados por dos subunidades; RNA Pol I transcribe los componentes de la subunidad grande, mientras que RNA Pol III se encarga de la subunidad pequeña. La subunidad grande se procesa a partir de un precursor de 45S, el rDNA 45S, el cual se transcribe a rRNA en el FC y el procesamiento ocurre en el límite entre el FC y el DFC para formar los rRNAs 5.8S, 18S y 28S, los cuales se transportan al GC para ensamblar el ribosoma (Boisvert, van Koningsbruggen et al. 2007) (Figura 7).

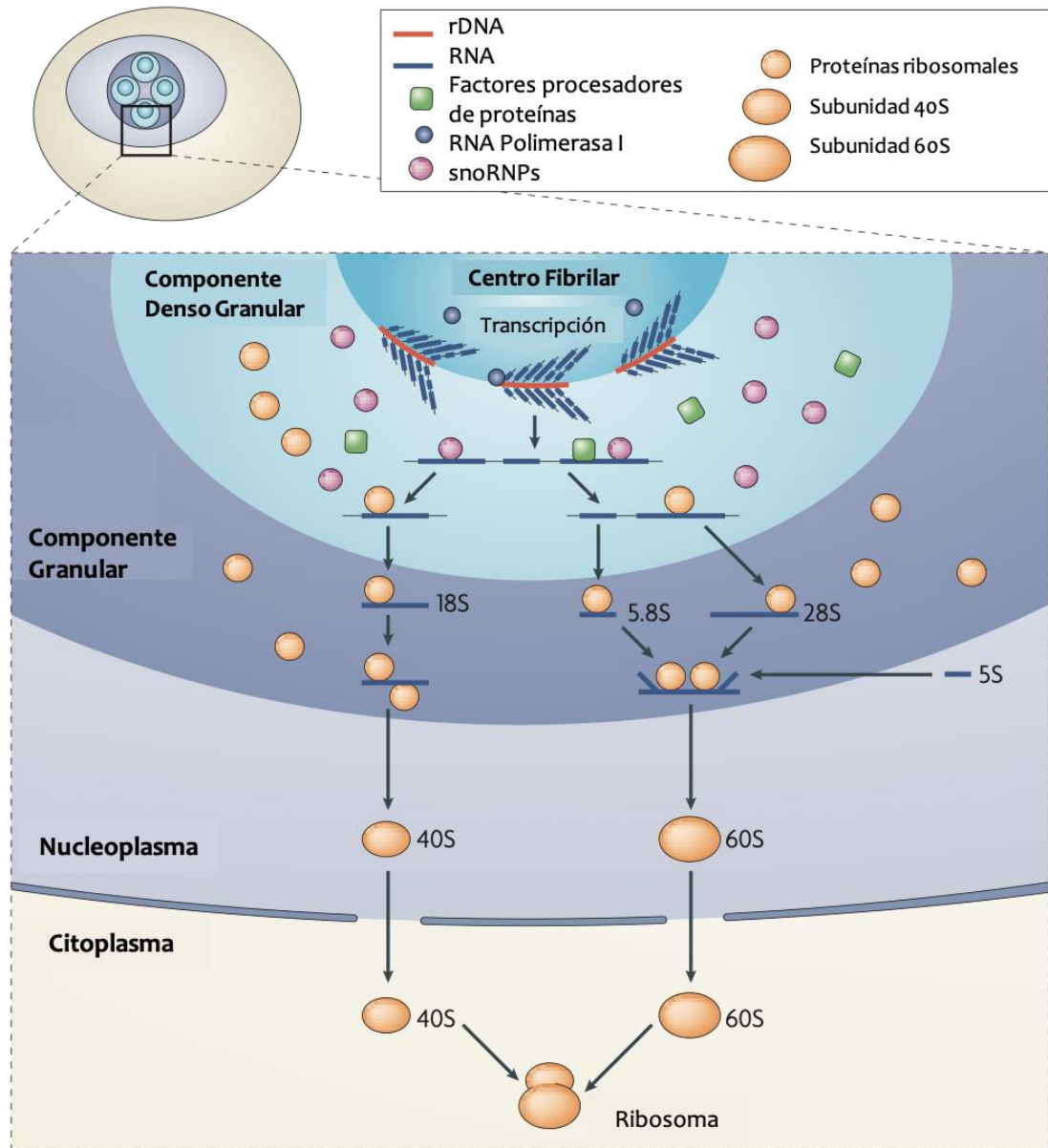


Figura 7. Estructura del nucléolo

La transcripción se lleva a cabo en el centro fibrilar, el procesamiento de los transcritos en el componente denso fibrilar y el ensamblaje en el componente granular (Boisvert, van Koningsbruggen et al. 2007).

No se ha establecido la existencia de una secuencia de localización nucleolar (NoLS), aunque se ha sugerido que al igual que la secuencias de localización nuclear (NLS), una NoLS requiere de regiones ricas en arginina y lisina (Andersen et al, 2005). Se han descrito más de 6,000 proteínas que se localizan al nucléolo, aunque de diferente forma; algunas, como la

nucleolina, fibrilarina y nucleofosmina, están involucradas en la biogénesis ribosomal, lo que significa que residen principalmente en el nucléolo. Las proteínas ribosomales se transportan del nucléolo al citoplasma, así que no son residentes permanentes. De manera interesante, la mayoría de las proteínas que localizan al nucléolo no están involucradas en la biogénesis ribosomal, lo cual sugiere que el nucléolo tiene otras funciones. Una gran cantidad de proteínas nucleolares están involucradas en procesos como procesamiento de mRNA, replicación o reparación de DNA, o simplemente no se ha descrito su función, lo que indica que existen funciones adicionales que aún no han sido identificadas.

Las tres proteínas mejor estudiadas son la nucleolina, fibrilarina y nucleofosmina, las cuales, además de su función en la biogénesis ribosomal, se ha encontrado que presentan otras funciones en la biología celular. Estas proteínas han sido implicadas en el ciclo celular de múltiples virus, a través de su interacción con proteínas de virus de RNA.

La nucleolina es una fosfoproteína y está localizada en el DFC y está involucrada en el procesamiento del rRNA 45S (Scherl, Coute et al. 2002). La fibrilarina se localiza en el DFC y es un componente de una ribonucleoproteína nucleolar pequeña (snRNP) que participa en el procesamiento de rRNA prerribosomal (Andersen, Lyon et al. 2002).

Nucleofosmina

La nucleofosmina, o B23, es una proteína multifuncional localizada principalmente en el nucléolo pero que se transporta constantemente entre los compartimentos citoplásmico y nuclear de la célula. B23 pertenece a la familia de chaperonas moleculares nucleoplasminas y está conformada por tres dominios. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio de oligomerización (OD), mientras que en el extremo C-terminal se encuentra un dominio de unión a RNA (RBD). En el centro se encuentra un dominio de unión a histonas (HBD). B23 está localizada en el GC, el cual contiene

subunidades prerribosomales maduras y está involucrada en el ensamblaje de los ribosomas, donde es necesaria para el procesamiento eficiente del rRNA. Posee funciones de RNasa y endoribonucleasa, uniéndose de manera preferente a ssRNA y ssDNA. También se ha descrito su interacción con proteínas del huso mitótico, uniéndose a centrosomas sin duplicar. El complejo CDK2/ciclina E fosforila a B23, promoviendo la duplicación de los centrosomas; al inhibir su fosforilación, los centrosomas no pueden duplicarse (Itahana, Bhat et al. 2003).

B23 también participa en la transcripción de RNA Pol II y se ha descrito como un promotor o supresor de tumor dependiendo de sus niveles de expresión (Rubbi and Milner 2003). Cuando B23 se une al inhibidor ARF, MDM2, una ubiquitín ligasa, se une a p53, promoviendo su degradación (Gjerset 2006).

LOS VIRUS Y EL NUCLÉOLO

Con algunas excepciones, los virus de RNA no necesitan de la maquinaria celular para replicar su genoma debido a que codifican sus propias proteínas para este propósito, principalmente una helicasa y una polimerasa. A diferencia de los virus de DNA, los virus de RNA no poseen un paso de transcripción, por lo que el núcleo parece ser irrelevante para la replicación. Se ha observado que en el caso de algunos virus de cadena sencilla, de polaridad positiva, el núcleo puede ser removido de la célula con ayuda de la citocalasina B y después infectado y el virus se replicará con una eficiencia similar a las células con el núcleo intacto. Sin embargo, una pequeña reducción puede observarse en estas células, lo que sugiere que el nucléolo no está relacionado directamente en la replicación de los virus de RNA, pero afecta otros eventos en el ciclo viral.

Varias proteínas de virus de DNA y RNA interactúan con B23 durante el proceso infeccioso. Se ha encontrado que estas interacciones involucran a los tres dominios funcionales de B23. Se ha reportado que algunas

proteínas virales poseen un motivo rico en arginina, el cual actúa como sitio de unión a B23, regulando su transporte al compartimento nuclear (Lobaina and Perera 2019). Este motivo se ha encontrado en proteínas de virus como el virus de necrosis nerviosa (Mai, Huang et al. 2017), el virus de hepatitis C (HCV) (Mai, Yeh et al. 2006) o el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) (Aminev, Amineva et al. 2003), aunque no se ha identificado en proteínas de virus como JEV, las cuales se sabe que interactúan de manera directa con B23, lo cual sugiere que otras regiones deben estar involucradas en la unión con estas proteínas.

En el caso de poliovirus (PV), no se ha observado interacción de proteínas virales con el nucléolo, pero se ha reportado que la nucleolina se transporta al citoplasma en presencia del virus (Waggoner and Sarnow 1998). La proteasa 3C de rinovirus humano (HRV) también se ha observado que promueve la translocación de la nucleolina al citoplasma (Walker, Younessi et al. 2013). Las proteínas 2A y el precursor 3BCD del virus de encefalomiocarditis (EMCV) se translocan al nucléolo. Se ha observado que 2A posee una NoLS funcional y colocaliza con B23, aunque no se ha descrito una interacción directa (Aminev, Amineva et al. 2003).

La proteína de cápside del virus de Chikungunya (CHIKV) posee un NoLS en la región N-terminal. Al mutar esta región, se observó una reducción en la eficiencia de replicación. De manera interesante, ratones que fueron retados con esta mutante no mostraron signos de enfermedad, sugiriendo una correlación entre la localización nucleolar de la proteína de cápside y la infectividad viral (Thomas, Rai et al. 2013).

La proteína de cápside del virus de necrosis nerviosa (NNV) se localiza al nucléolo de las células infectadas, donde se asocia a B23 y promueve su redistribución al nucleoplasma. Al hacer knockdown de B23, se redujo la eficiencia replicativa de NNV. Se encontró un NoLS en el extremo N-terminal de esta proteína (Mai, Huang et al. 2017).

Los flavivirus y el nucléolo

La proteína de cápside (C) es la proteína mejor estudiada con respecto a la localización nuclear y nucleolar. La mayoría de los flavivirus presenta localización nuclear de C. Se ha observado que la proteína de cápside del virus de West Nile (WNV) requiere la unión a la helicasa nucleolar DDX56 para lograr una replicación exitosa. También se ha observado que esta proteína secuestra a MDM2 al nucléolo (Yang, Lee et al. 2008).

La proteína de cápside del virus de encefalitis japonesa (JEV) también se localiza al nucléolo de células infectadas y se asocia con B23, translocándola del nucléolo al citoplasma, y se ha observado que al sobreexpresar una “dominante negativa” truncada de B23, la replicación de JEV se ve inhibida, lo cual sugiere que B23 está involucrada en el ensamblaje de la partícula viral. Se ha reportado la interacción de la proteína de cápside del virus del dengue (DENV) con el nucléolo pero no se ha encontrado asociación con B23 (Tsuda, Mori et al. 2006).

Se ha involucrado a la nucleolina en el ingreso y egreso de DENV, además de su función en el ensamblaje del virión de DENV. La proteína de cápside de DENV forma interacciones con la nucleolina en el nucléolo de células infectadas, y se ha observado que al inhibir a la nucleolina con siRNA, los títulos virales disminuyen significativamente (Balinsky, Schmeisser et al. 2013).

La proteína de cápside de otro flavivirus, el virus de hepatitis C (HCV), es capaz de asociarse con el nucléolo y en células transfectadas, C puede unirse a p53 e incrementar su actividad de unión a DNA, aumentando así la expresión de p21 (Hirano, Kaneko et al. 2003).

Por otra parte, se ha observado que NS5 de algunos flavivirus se localiza en el núcleo de células infectadas, aunque su localización es motivo de controversia (Hannemann, Sung et al. 2013, Tay, Fraser et al. 2013). Hasta

el momento, no se ha descrito su interacción con proteínas nucleolares. En el caso de HCV, se ha observado que NS5B se asocia a nucleolina a través de dos regiones independientes de NS5B. Al mutar estas regiones, la replicación de HCV en células Huh7 fue abatida por completo. Al utilizar un siRNA contra nucleolina, también se observó la inhibición de la replicación de HCV, confirmando el requerimiento de nucleolina para la replicación de HCV (Kusakawa, Shimakami et al. 2007).

Se ha descrito la asociación de otra proteína flaviviral, NS1, con el nucléolo del virus del Zika (ZKV) y el virus Langat (LGTV), aunque esta asociación no se ha descrito a detalle (Buckley and Gould 1988).

JUSTIFICACIÓN

La proteína NS5 del virus de dengue es una proteína multifuncional. Además de su papel en la replicación del genoma viral y en la formación del cap viral, se han descrito interacciones con proteínas del huésped, lo que sugiere que NS5 puede tener otras funciones aún no descritas. La mayoría de los virus de RNA replican en el citoplasma de las células infectadas, y su interacción con el núcleo parecería innecesaria. Sin embargo, en el caso de algunos flavivirus, la proteína NS5 se transloca al núcleo de las células infectadas. Hasta la fecha, se desconoce la función de la forma nuclear de la proteína NS5, pero se han reportado interactomas donde la proteína NS5 podría estar interactuando con proteínas nucleares y/o nucleolares. Resultados de nuestro laboratorio mostraron que hay colocalización entre la proteína B23 y la proteína NS5. La nucleofosmina es una proteína multifuncional residente del nucléolo, que se ha encontrado interactuando con diferentes proteínas virales, como la proteína de cápside de JEV, donde al mutar B23, se inhibe la replicación viral, sugiriendo un papel importante en la replicación de este virus.

Identificar y confirmar la interacción con una proteína nuclear podría ser un paso importante en la determinación de la función de la forma nuclear de NS5.

Existen múltiples interactomas de NS5 que evalúan la interacción de esta proteína con proteínas celulares. En el más reciente estudio, a través de un análisis de doble híbrido, se encontró que la proteína B23 podría ser un blanco de NS5 (De Maio, Risso et al. 2016). Varios estudios han detectado a la proteína NS5 en el núcleo de células infectadas, lo cual podría sugerir que NS5 y B23 estarían formando un complejo (Uchil, Kumar et al. 2006).

La proteína B23 es una proteína principalmente nucleolar; es una proteína multifuncional involucrada en el procesamiento y ensamblaje del rRNA, al igual que en la regulación de la cromatina, duplicación de centrosomas y la vía apoptótica (Box, Paquet et al. 2016, Scott and Oeffinger 2016). Se

ha descrito su interacción con proteínas virales, como la proteína Core de HCV (Mai, Yeh et al. 2006) y la proteína de Cápside de JEV, pero no con la proteína de Cápside de DENV-2 (Tsuda, Mori et al. 2006).

HIPÓTESIS

- La proteína NS5 del virus del dengue serotipo 2 se localiza en el núcleo a través de la interacción con proteínas nucleares (LMNA/C, B23) regulando eventos que repercuten sobre la biología del virus.

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar las interacciones entre la proteína no estructural 5 (NS5) del DENV-2 y proteínas nucleares (LMNA/C, B23), así como su efecto en el ciclo viral.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la colocalización de la proteína no estructural 5 (NS5) del virus DEN-2 y proteínas nucleares seleccionadas (LMNA/C, B23) por ensayos de inmunofluorescencia.
2. Evaluar la interacción por ensayos bioquímicos entre la proteína NS5 y las proteínas seleccionadas.
3. Por medio del silenciamiento de los mRNAs que codifican para las proteínas seleccionadas, evaluar el efecto sobre la biología del virus.
4. Evaluar interacciones proteína-proteína a través de ensayos de docking entre NS5 y una de las proteínas seleccionadas, B23.

MATERIAL Y MÉTODOS

PROPAGACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL VIRUS

Se prepararon abastos virales del serotipo 2 del virus dengue: DENV-2 (Nueva Guinea C). Los virus se propagaron en la línea celular C6/36 proveniente de la larva de *Aedes albopictus* (Tesh 1979). Las células se crecieron a 36 °C sin ambiente de CO₂. Se utilizó medio mínimo esencial (MEM, GIBCO), suplementado con suero fetal bovino (SFB, GIBCO) al 10 %, vitaminas, antibiótico, aminoácidos, L-glutamina y piruvato (todos de GIBCO), 100 unidades/ml de cada uno y 10 unidades/ml de tylosina. Una vez que el efecto citopático (evidenciado por la formación de sincicios) era de aproximadamente el 60 %, se recuperó el sobrenadante y se centrifugaron a 1,200 rpm a 4 °C, durante 5 minutos. La pastilla resultante se desechó y el sobrenadante se recuperó en tubos Falcon de 50 ml. Se concentró aproximadamente unas 10 veces en columnas de Amicon Ultra 15 con un cut-off de 100 kDa. Se filtró el sobrenadante con filtros de 0.22 µm y se adicionó 1/10 del volumen final de SPG. Finalmente se prepararon alícuotas de 50 µl del sobrenadante que contiene al virus y se almacenaron a -70 °C.

MÉTODO DE TITULACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE POR ENSAYO DE PLACAS EN CÉLULAS VERO

Para la titulación de DENV-2 se utilizaron células VERO provenientes de epitelio de riñón de mono verde. Estas células se crecieron en medio RPMI suplementado con SFB al 5 %, antibiótico, vitaminas, aminoácidos y L-glutamina a 100 unidades/ml de cada uno a 37 °C en un ambiente al 5 % de CO₂. Se sembraron 130,000 células por pozo en placas de 24 pozos y 12 horas después se hicieron los ensayos de titulación. Se prepararon tubos Eppendorf estériles; se marcaron desde 10⁻¹ a 10⁻⁶ y se colocaron en hielo. En condiciones de esterilidad se adicionaron 225 µl de medio Hanks (GIBCO) a cada tubo y se mantuvieron en hielo. El virus se descongeló directamente de -70 °C a 4 °C y se colocó en hielo. Se

transfirieron 25 µl del inóculo al primer tubo y se mezcló vigorosamente en el agitador. Posteriormente, con una punta nueva se añadieron 25 µl de esta dilución al siguiente tubo seguido de un vórtex, y así sucesivamente hasta completar 6 diluciones. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Previo a la inoculación, se decantó la placa en un recipiente y cada pozo fue inoculado con 100 µl de las diferentes diluciones del virus; como controles se utilizaron células no infectadas y células a las que se les adicionó el virus sin diluir. Se incubaron por 1 h a 37 °C en una atmósfera de humedad al 5 % de CO₂ y después de este tiempo se añadieron 500 µl/pozo de medio Overlay: metilcelulosa (SIGMA) suplementada con suero fetal bovino al 2 %, 1 unidades/ml de antibiótico, y medio RPMI. Finalmente, las células se incubaron a 37 °C durante 5 días. Al término de esta incubación se decantó el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS 1X. Se fijaron las células con metanol al 80 % y se bloquearon con PBS 1X con leche descremada al 5 %. Se añadió el anticuerpo primario que reconoce la proteína de envoltura (4G2) a una dilución 1:2,000. Posteriormente se incubaron las células con un anticuerpo secundario acoplado a HRP. Posteriormente se adicionó True blue y después se contaron las placas utilizando la siguiente fórmula:

$$(\text{Log})(\text{Promedio de placas} \times 10^{x+1})$$

Donde x=dilución en la que se contaron las placas.

EXTRACCIÓN DE RNA

Se retira el medio de la botella y se adiciona 1 ml de trizol (Research Organics) directamente a la monocapa. Se deja 5 minutos en reposo y se recupera en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se adicionan 200 µl de cloroformo (SIGMA) y se homogeniza agitando 20 veces. Se deja 3 minutos en reposo. Se centrifuga a 13,000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se recupera la fase de arriba y se adicionan 500 µl de isopropanol (SIGMA). Se centrifuga a 13,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se desecha el sobrenadante y se adiciona 1 ml de etanol (SIGMA) al 75 %. Se centrifuga a 7,500 rpm por 5 minutos a 4 °C dos veces. Se decanta por completo y

se deja secar. Finalmente se adicionan 15 μl de H_2O libre de nucleasas y se amplifica con las siguientes condiciones:

RNA TOTAL	15 μl
BUFFER 10X	2.5 μl
DNAsa I	0.75 μl
H₂O	6.75 μl
VOLUMEN FINAL	25 μl

SÍNTESIS DE cDNA

Se amplificó cDNA a partir del RNA obtenido. La cantidad de RNA debe cuantificarse y adicionar a la reacción 2 μg de RNA. Se utilizaron hexámeros (Invitrogen) para la reacción con las siguientes condiciones:

RNA TOTAL	—————
HEXÁMEROS	1.5 μl
BUFFER FIRST STRAND	6 μl
dNTP 1.25 mM	1.2 μl
DTT 0.1 M	3 μl
SUPER SCRIPT	1 μl
H₂O	15.93 μl
VOLUMEN FINAL	30 μl

EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NS5

Como vector de expresión se utilizó el plásmido pET151/D-TOPO (Invitrogen) cuyo origen de expresión bacteriano proviene del plásmido

pBR322; contiene el gen de resistencia a la ampicilina para la selección de clonas recombinantes; el gen lac que permite la transcripción de la proteína de fusión bajo el promotor del operón lac, el cual, al adicionar un análogo de la lactosa como el isopropil tiogalactósido (IPTG) se induce la síntesis de la proteína de interés; además posee un promotor T7 y codifica para una cola de histidinas (6x) y un epítipo V5.

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Se tomó una colonia de bacterias de la cepa de *E. coli* BL21 y se sembró en medio Luria Bertani (LB) y se creció a 37 °C durante 12 horas. El cultivo se resembró en 50 ml de LB a una dilución 1:20 y se incubó a 37 °C por una hora hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3 a 0.4, a 600 nm. El cultivo bacteriano se centrifugó a 1,000 g por 15 minutos a 4 °C en tubos Falcon (Corning) de 50 ml. La pastilla se resuspendió en 1/10 del volumen inicial de TSS2X,pH6.5(LB,PEGal10 %,DMSOal5 %y 20-50 mM deMgCl2 y en medio LB (2.5 ml de TSS 2X y 2.5 ml de LB).

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

La región de NS5 que se clonó en el vector de expresión abarca los nucleótidos 7,624-10,270 que codifica para la proteína NS5 completa menos 60 nucleótidos del extremo 5'. Cultivos de la cepa de *E. coli* One Shot TOP 10 serán transformados con el plásmido pET151/D-TOPO/NS5; se adicionaron 3 µl de la reacción de clonación a las bacterias competentes y se incubó a 4 °C por 20 minutos; posteriormente se sometieron a choque térmico incubando a 42 °C por 30 segundos sin agitar, seguido de una inmersión en hielo. Se adicionaron 250 µl de medio S.O.C. atemperado y se incubó a 37 °C por una hora sin agitar. Finalmente se sembraron en placas Petri con agar LB suplementadas con 120 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C toda la noche.

INDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE NS5

Se picó una colonia de cada placa y se inoculó en 7 ml de caldo LB con 120 µg/ml de ampicilina a 37 °C, en agitación a 220 rpm durante 12 horas

y se utilizó como semilla para un cultivo de 250 ml de LB, el cual una vez que alcance una O.D. entre 0.4 y 0.5 a 600 nm, se le adicionó IPTG a una concentración final de 1.0 mM para inducir a la proteína recombinante NS5. Se tomaron muestras de 3 ml del cultivo a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas después de la inducción. Como control negativo se tomaron muestras de un cultivo sin inducir a los mismos tiempos. Se prepararon geles de poliacrilamida al 10 %, en los cuales se analizó la inducción de la proteína recombinante NS5, la cual tiene un peso de aproximadamente 104 kDa.

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA NS5

Para la purificación de la proteína recombinante NS5, se obtuvieron los cuerpos de inclusión formados por las proteínas de fusión dentro del citoplasma bacteriano. Brevemente, el cultivo se centrifugó y el paquete celular se resuspendió en una solución de sacarosa al 15 %, tritón X-100 al 0.12 % y Tris pH 8.0 50 mM, el cual se sonicó. Se centrifugó a 8,000 rpm durante 20 minutos. La pastilla resultante se resuspendió de nuevo en una solución de tritón X-100 al 0.12 %, Tris pH 8.0 50 mM y EDTA 10 mM. Nuevamente la suspensión obtenida se sonicó y se centrifugó para resuspender otra vez la pastilla en una solución de Tris 50 mM y EDTA 10 mM. Se agregó regulador de muestra Laemmli 6X y la muestra se hirvió por 5 minutos; después se corrió en un gel preparativo de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8 % de 25 x 25 cm (Katrak, Mahon et al. 1992).

La banda correspondiente a las proteínas de interés se identificó según el protocolo descrito anteriormente (Lee, Levin et al. 1987), el cual consiste en sumergir una porción del gel de poliacrilamida en una solución 0.6 M de CuCl₂ por 5 minutos, lo cual permite observar una imagen de bandas de la proteína de interés. Una vez transcurrido el tiempo, la porción del gel sumergido se alineó con el resto del gel en donde se encuentran los marcadores y se cortó la banda. Posteriormente, el gel se disgregó con el émbolo de una jeringa y se dejó difundir en el mínimo volumen de PBS a 4 °C toda la noche. Se realizó una nueva ronda de purificación usando un gel preparativo. Finalmente se determinó la concentración de proteínas de

cada muestra, se verificó su pureza por SDS-PAGE y Western Blot (WB).

Para los ensayos de Western Blot e Inmunofluorescencia se utilizaron células Vero provenientes de epitelio de riñón de mono verde (Matsumura, Stollar et al. 1971). Estas células se crecieron en medio RPMI (GIBCO) suplementado con SFB (GIBCO) al 5 %, vitaminas, antibiótico, aminoácidos y L-glutamina (GIBCO), 100 unidades/ml de cada uno. Estas células son adherentes y forman una monocapa, la cual debe despegarse utilizando Tripsina (SIGMA) al 0.05 % y EDTA (Research Organics) al .05 % en PBS 1X.

ENSAYO DE WESTERN-BLOT

Células Vero se infectaron con DENV-2. Se siguió la infección. Como control se utilizaron células Vero sin infectar o tratadas con virus inactivado por calor. Después, las células se lisaron con buffer RIPA (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 2 % Tritón X-100, 150 mM NaCl, 0.6 M KCl, 5 mM EDTA) en presencia de inhibidor de proteasas (Complete, Invitrogen). Los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE cargando 50 µg/ml por pozo y las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD), las cuales se bloquearon con PBS-Tween-Leche durante una hora y después se lavaron cuatro veces con PBS- Tween. Posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante una hora. Después, las membranas se lavaron de nuevo y se incubaron con un anticuerpo IgG [H+L] anti-rata acoplado a HRP (Invitrogen) y/o IgG [H+L] anti-conejo acoplado a HRP (Invitrogen). Después de otra ronda de lavados, las membranas se revelaron en presencia del reactivo de revelado (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, a través del equipo ChemiDoc (BIO-RAD).

FRACCIONAMIENTO CELULAR

Células Vero infectadas, no infectadas o tratadas con virus inactivado por calor fueron utilizadas para hacer extractos citoplásmicos y nucleares con ayuda del kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction (Thermo-Scientific) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las células se despegaron de acuerdo al protocolo ya descrito y se lavaron con PBS 1X. El sobrenadante se desechó tratando que la pastilla quedara lo más seca posible. Se adicionaron los reactivos del kit a la pastilla de acuerdo a la siguiente tabla:

Volumen celular (µL)	CER I (µL)	CER II (µL)	NER (µL)
10	100	5.5	50
20	200	11	100
50	500	27.5	250
100	1000	55	500

Tabla 1. Relación de los reactivos del kit NE-PER Nuclear & Cytoplasmic Extraction con el volumen celular

Los reactivos se adicionan en el siguiente orden; CER I, CER II y NER. Entre cada reactivo se debe dar vórtex durante 15 segundos y centrifugar a 13,000 rpm. Los extractos deben almacenarse a una temperatura de -80 °C.

ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN

Para realizar los ensayos de inmunoprecipitación, se utilizaron perlas de sefarosa acopladas a proteína G (SIGMA ALDRICH). Se utilizaron lisados de células Vero infectadas, no infectadas o tratadas con virus inactivado por calor. Las células se lisaron de acuerdo al protocolo ya descrito, se cuantificó la cantidad de proteínas totales y se hizo una mezcla con 500 µg de proteínas totales, 2-10 µg/ml de anticuerpo y PBS a un volumen final de 500 µl. Se dejaron interactuar toda la noche a 4 °C.

Posteriormente, se dieron lavados a las perlas y se eluyeron con PBS, ya sea en condiciones desnaturizantes o no desnaturizantes. Se realizó un SDS-PAGE de las fracciones eluidas y se hizo un WB de este.

ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Se sembraron 100,000 células Vero por pozo en placas de 24 pozos. Cada pozo contiene un cubreobjetos. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C en un ambiente de humedad al 5 % de CO₂ y posteriormente las células se infectaron a una multiplicidad de 10 con virus purificado. Se realizaron cinéticas de infección de 12, 24, 36 y 48 horas incubando a la par, controles de células tratadas con virus inactivo a los mismos tiempos, controles de células sin infectar así como células infectadas para teñirlas con el correspondiente control de isotipo. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA, SIGMA) al 4 % en PBS 1X durante 40 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se permeabilizaron con PBS-Tritón-gelatina al 0.2 % durante 1 hora. Se bloquearon las monocapas con solución PBS-Tritón-suero de chivo al 1 % durante 30 minutos y después se dejaron en presencia de los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la detección de la proteína de envoltura E se utilizó un anticuerpo monoclonal IgG2b hecho en ratón desarrollado en nuestro laboratorio (Leon-Juarez, Garcia-Cordero et al. 2013) a una dilución 1:25 y un anticuerpo IgG [H+L] anti-ratón acoplado a Cy3 (Invitrogen). Para la detección de la proteína no estructural 5 (NS5) de DENV se utilizó un anticuerpo monoclonal de rata de clase IgG2a desarrollado en nuestro laboratorio (Garcia-Cordero, Carrillo-Halfon et al. 2014) a una dilución 1:100 y un anticuerpo IgG [H+L] anti-rata acoplado a Alexa Flúor 488 (Invitrogen). Para la detección de la proteína lamina A se utilizó un anticuerpo policlonal de ratón (SIGMA) a una dilución 1:100 y un anticuerpo IgG [H+L] anti-conejo acoplado a Cy3 (Invitrogen). Para la detección de la proteína B23, se utilizó un anticuerpo policlonal de ratón (SIGMA) a una dilución 1:100 y un anticuerpo IgG [H+L] anti-conejo acoplado a Cy3 (Invitrogen). Al término de la inmunofluorescencia, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos

utilizando Vecta Shield H-1200 con DAPI (Vector) y se analizaron en un microscopio confocal espectral Leica (Leica TCS SP5).

ENSAYOS DE KNOCKDOWN

Se sembraron 120,000 células en placas de 24 pozos en 500 µl de medio con suero y antibiótico. Las células se incubaron durante 24 horas como mínimo a 37C y a 5 % de CO₂. Se hicieron las diluciones de las muestras como indica la tabla. Previo a la adición de los complejos, se lavaron las células con PBS 1X una vez. Los complejos se adicionaron gota a gota agitando la placa para una mejor distribución. Las células se incubaron durante 3 horas a 37C a 5 % de CO₂ y una vez pasado este período de incubación, se lavaron con PBS 1X una vez y adicionó medio fresco con suero y antibiótico.

Preparación de los complejos

	siRNA ctrl A (0.112 µg)	siRNA B23 (1.6 µg)
siRNA	4 µl	12 µl
Enhancer R	0.22. µl	3.2 µl
TransMessenger	0.56 µl	8 µl
Buffer EC-R	95.22 µl	76.8 µl
Volumen Final	100 µl	100 µl

Proporción siRNA (µg) a reactivos de transfección (µl)

siRNA (µg)	Enhancer R (µl)
1	2
siRNA (µg)	TransMessenger
1	5

ENSAYOS DE DOCKING

Se buscaron las secuencias reportadas de NS5 en la base de datos Uniprot. A través del programa Protein BLAST, se seleccionaron las cinco estructuras con un score de homología más alto con la proteína NS5.

Número de Acceso en el Protein Data Bank	Porcentaje de Homología con NS5
5CCV	99 %
4V0Q	98 %
4V0R	98 %
5DTO	98 %
4C11	98 %

Tabla 2. Evaluación de la homología entre las secuencias reportadas de NS5.

Utilizando el programa Modeller (Webb and Sali 2017), se corrieron las cinco secuencias y se obtuvieron 20 modelos por secuencia. Se buscó el modelo con menor energía o DOPE score. El DOPE score es un potencial estadístico utilizado para evaluar modelos homólogos en la predicción de la estructura proteica. El programa Modeller arrojó un modelo a partir de la secuencia 5CCV, la cual posee el menor DOPE score.

No se ha reportado la secuencia completa de la proteína B23, por lo que se utilizó el programa I-TASSER (Yang, Yan et al. 2015), el cual detecta estructuras templado del Protein Data Bank mediante una técnica llamada *threading*. Los modelos estructurales se construyen al reensamblar fragmentos estructurales de templados. Se obtuvieron cinco modelos de B23 a través de I-TASSER.

Se corrieron los cinco modelos de B23 obtenidos a través de I-TASSER y el modelo seleccionado de NS5 en ClusPro y este a su vez generó 30 modelos de cada interacción, obteniendo 150 modelos en total.

Los modelos generados se corrieron en el programa PDBsum, el cual arrojó los puntos de contacto entre NS5 y B23 en los 150 modelos.

Se analizaron los residuos más sobrerrepresentados en los 150 modelos para determinar el posible punto de contacto entre NS5 y B23.

RESULTADOS

COLOCALIZACIÓN ENTRE NS5 Y PROTEÍNAS NUCLEARES

Debido a que existen reportes previos sobre una posible interacción entre NS5 y lamina A/C (LMNA/C) (Uchil, Kumar et al. 2006, Garcia-Cordero, Carrillo-Halfon et al. 2014), incluyendo un reporte de nuestro grupo, elegimos a esta proteína para evaluar su interacción con la proteína NS5.

La proteína LMNA/C es una proteína estructural involucrada en la formación de la lámina nuclear. Está ligada tanto a replicación como a la transcripción celulares y puede unirse al DNA de manera directa. Se ha reportado su interacción con proteínas de virus de DNA, como herpesvirus, citomegalovirus (CMV) y HIV-1 (Coffinier, Hudon et al. 2007, Sharma, Kamil et al. 2014, Wu, Pan et al. 2016), pero existen pocos reportes de su interacción con proteínas de virus de RNA.

Los virus de RNA en general replican en el citoplasma, por lo que la necesidad de migrar al núcleo podría considerarse innecesaria. Sin embargo, varios trabajos con diferentes virus de RNA han mostrado que ciertas proteínas de estos virus se llegan a localizar en el núcleo y en el nucléolo de las células infectadas. La proteína NS5 del virus DENV-2 se ha encontrado reiteradamente en el núcleo, a este respecto, se han conformado diferentes interactomas de la proteína NS5 para evaluar la interacción de esta proteína con proteínas celulares. En el más reciente estudio, a través de un análisis de doble híbrido, se encontró que la proteína B23 podría ser un blanco de NS5 (De Maio, Risso et al. 2016). Varios estudios han observado a la proteína NS5 de DENV-2 en el núcleo de células infectadas.

Para caracterizar la infección, de nuestro modelo de estudio utilizamos dos anticuerpos monoclonales generados en nuestro laboratorio que reconocen a las proteínas E y NS5 (Leon-Juarez, Garcia-Cordero et al. 2013, Garcia-Cordero, Carrillo-Halfon et al. 2014). La monocapa de células Vero se infectó a una MOI de 5 y las células se analizaron a las 48

h; como controles se usaron células incubadas con medio y células tratadas con virus inactivado por UV. En la figura 8 se observa un enriquecimiento de la proteína NS5 en el núcleo y nucléolo de células infectadas.

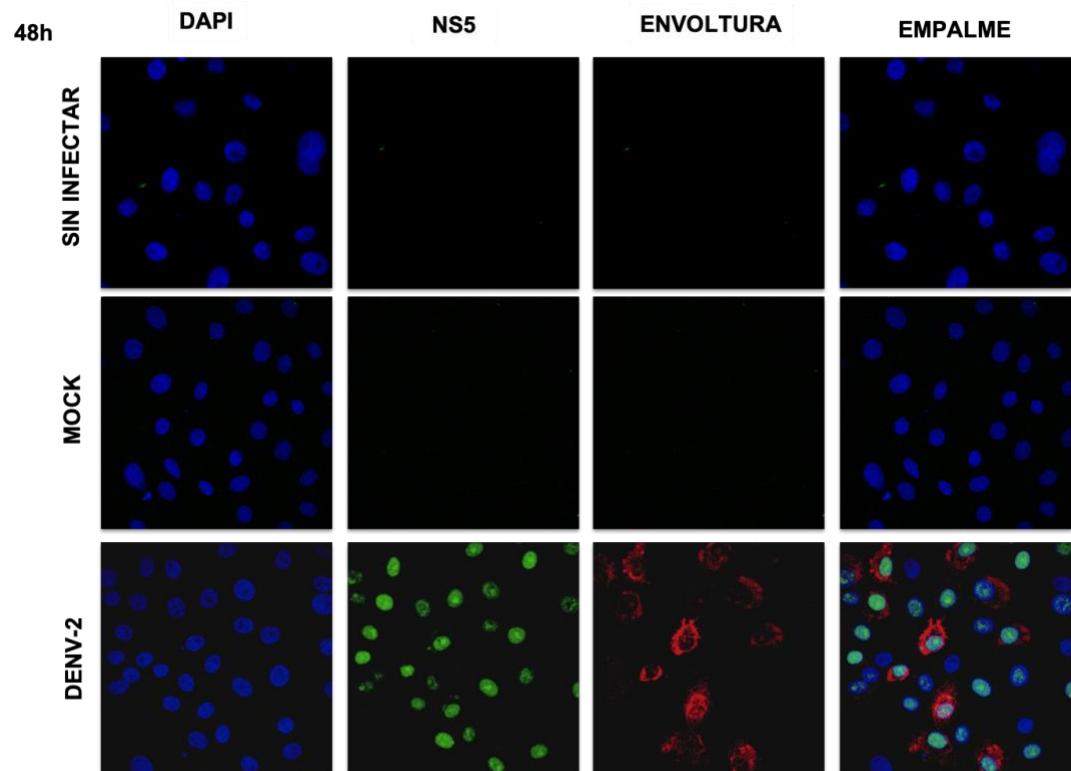


Figura 8. Caracterización de la infección

Se observa la presencia de las proteínas E en color rojo (Cy3) y la presencia de la proteína NS5 en verde (FITC) únicamente en las células infectadas.

Subsecuentemente, a través de ensayos de inmunofluorescencia, se evaluaron dos de las proteínas nucleares, LMNA y B23. A través del análisis de colocalización, se evaluó el índice de colocalización entre la proteína NS5 y las proteínas nucleares mencionadas. Utilizando el anticuerpo contra NS5 y anticuerpos comerciales contra LMNA/C y B23, observamos que ambas proteínas colocalizan con la proteína NS5, sin embargo este dato sugiere que las proteínas pudieran estar cercanas, pero no confirma interacción.

La colocalización entre NS5 y LMNA/C arrojó un coeficiente de

correlación de Pearson de 0.72 (Figura 9), mientras que la colocalización entre NS5 y B23 fue de 0.67 (Figura 10).

El cálculo de parámetros estadísticos microscópicos de fluorescencia, que ha dado lugar a la evaluación de la intensidad de la fluorescencia es el coeficiente de correlación de Pearson. La superposición de colores de dos marcadores fluorescentes diferentes, con, por ejemplo, fluorescencia verde y roja dan como resultado un color amarillo en caso de colocalización. Sin embargo, tal evaluación visual requiere intensidades de fluorescencia comparables de los dos marcadores y obviamente está lejos de ser cuantitativa.

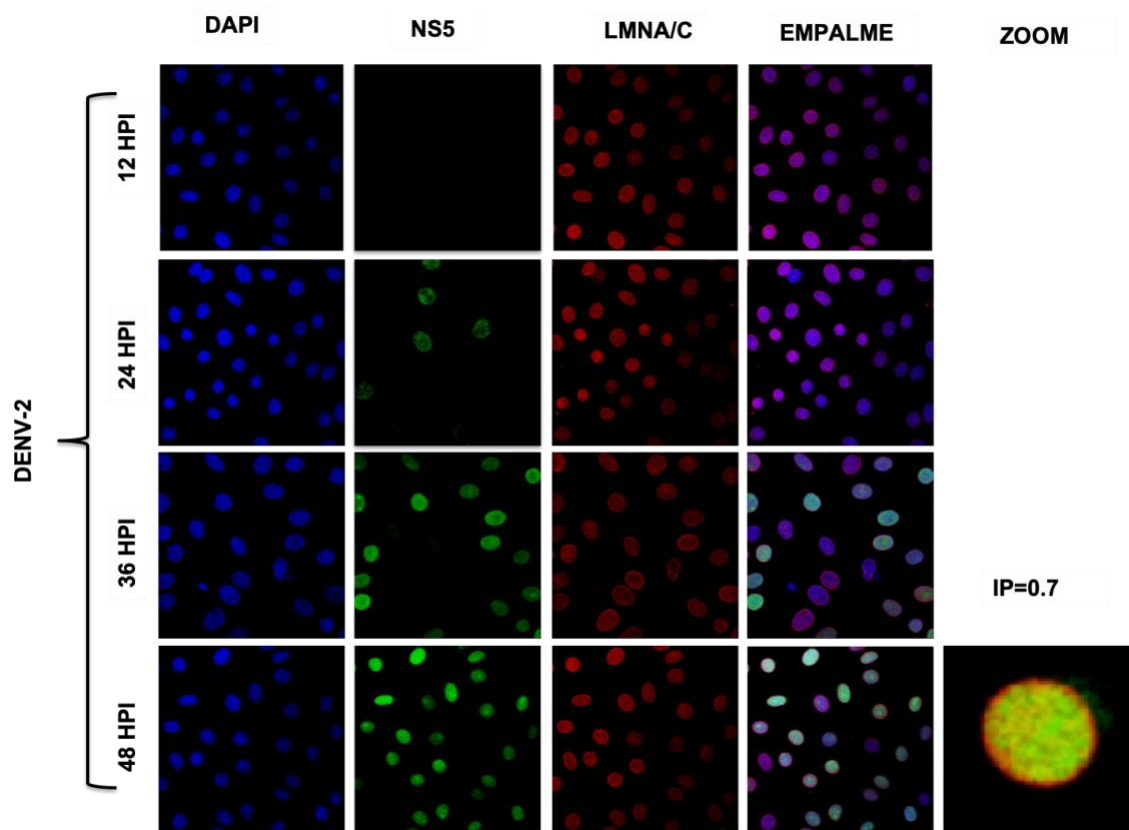


Figura 9. Evaluación de la colocalización entre NS5 y LMNA/C

Se observa un enriquecimiento de NS5 en el núcleo de las células infectadas a las 48 horas posinfección. Evaluación de la colocalización entre NS5 y B23. Células Vero fueron infectadas a una MOI de 5 y se analizó la infección a través de proteína NS5. Se observa un enriquecimiento de NS5 en el núcleo, e incluso nucléolo, de las células infectadas a las 48 horas posinfección.

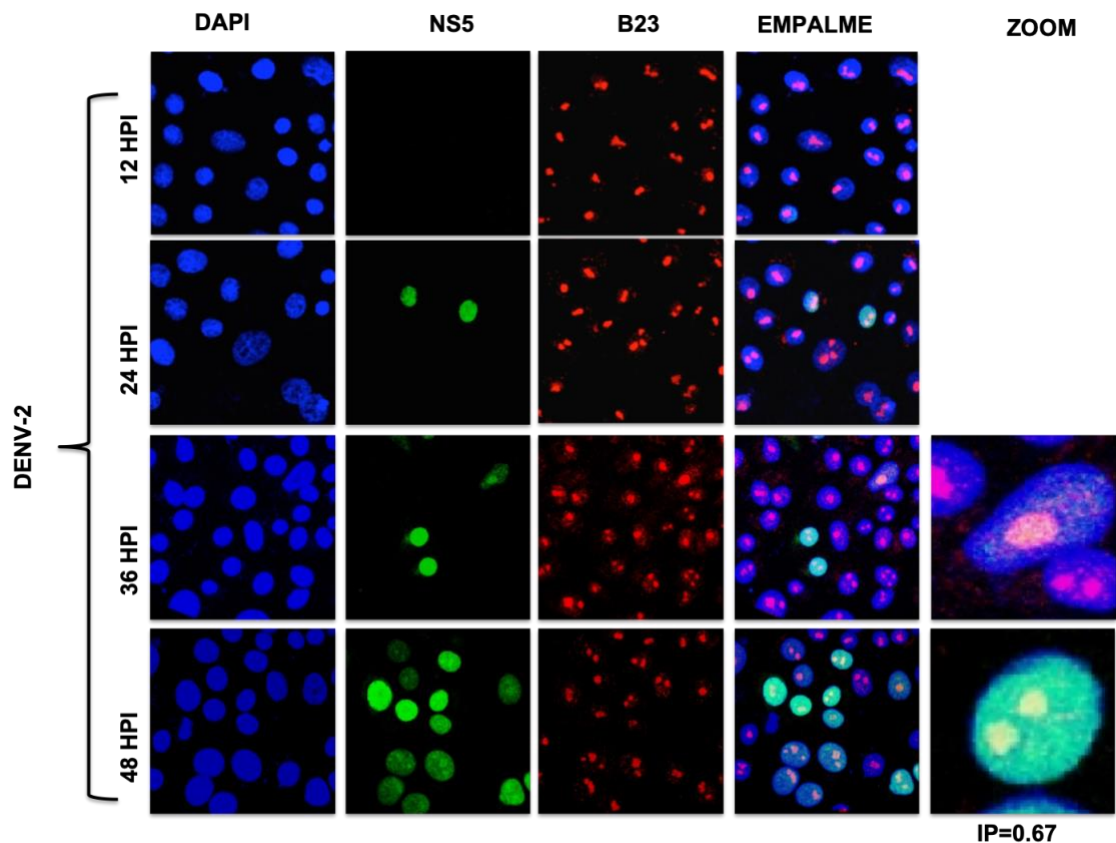


Figura 10. Evaluación de la colocalización entre NS5 y B23

Células Vero fueron infectadas a una MOI de 5 y se analizó la infección a través de proteína NS5. Se observa un enriquecimiento de NS5 en el núcleo, e incluso nucléolo, de las células infectadas a las 48 horas posinfección.

INTERACCIONES ENTRE NS5 Y PROTEÍNAS NUCLEARES

Los ensayos de colocalización sugieren que la proteína NS5 del virus DENV-2 podría interactuar con las proteínas nucleares. Con la finalidad de evaluar si la proteína NS5 se encuentra interactuando con proteínas nucleares o al menos saber si la proteína NS5 forma complejos con LMNA/C y B23, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando perlas de sefarosa acopladas a proteína G en presencia de anticuerpos dirigidos contra LMNA/C, B23 y como control, una inmunoglobulina no relacionada. Para evaluar si el fenómeno se lleva a cabo en células infectadas, se infectaron células Vero a una multiplicidad de infección de 5. A continuación, se hicieron lisados de fracciones citoplásmicas,

nucleares y totales de células Vero sin infectar, tratadas con virus inactivo o infectadas (Figura 11). Como marcador de la fracción nuclear, se usó un anticuerpo contra LMNA y para la fracción citoplásmica, se empleó un anticuerpo contra GADPH. Como era de esperarse, en las fracciones citoplásmicas y antes de fraccionar se encontró GADPH, así como en las fracciones nucleares se corroboró la presencia de LMNA únicamente en el extracto total de todas las condiciones y en el núcleo después de ser fraccionado.

Después de confirmar que los lisados estaban libres de contaminación de otras fracciones, se hicieron los ensayos de inmunoprecipitación. Después de incubar las fracciones con las perlas y los anticuerpos toda la noche a 4C, se realizaron ensayos de Western Blot con los eluatos. Para revelar se utilizó el anticuerpo contra NS5. Se observó la presencia de la proteína NS5 en las fracciones nucleares inmunoprecipitadas con los anticuerpos contra LMNA/C (Figura 12) o B23 (Figura 13), pero no en las fracciones inmunoprecipitadas con inmunoglobulinas no relacionadas, lo que sugiere que NS5 forma complejos con LMNA/C y B23 dentro del núcleo de las células infectadas. Por supuesto, la proteína NS5 también se encontró en las fracciones citoplásmicas de las células infectadas, ya que NS5 se encuentra de igual manera en citoplasma donde actúa como RNA polimerasa.

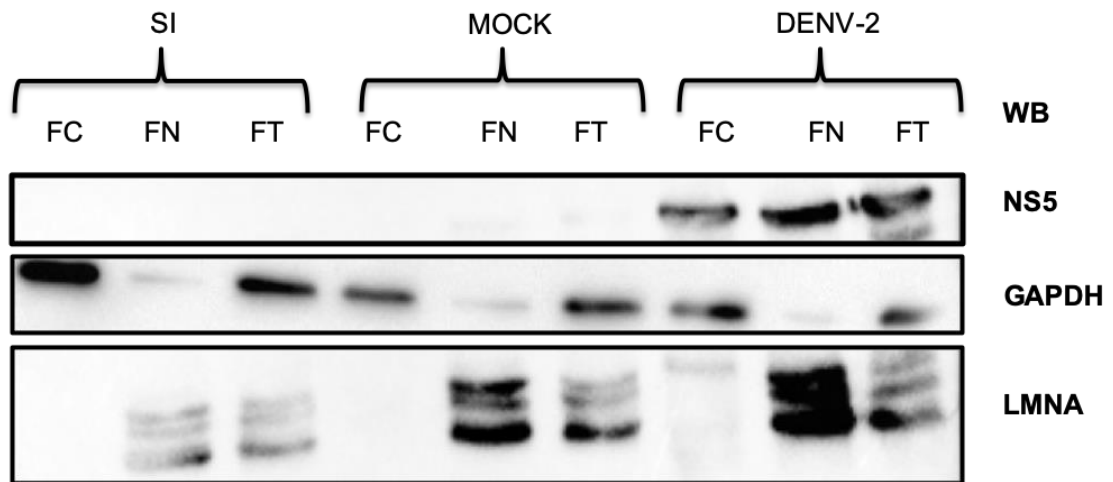


Figura 11. Preparación de fracciones

Se utilizaron lisados citoplásmicos, nucleares y totales de células Vero sin infectar, tratados con virus inactivo e infectados con DENV-2. Se observa la presencia de NS5 únicamente en los lisados de células infectadas. GAPDH se observa principalmente en los lisados citoplásmicos, mientras que LMNA se localiza principalmente en los lisados nucleares.

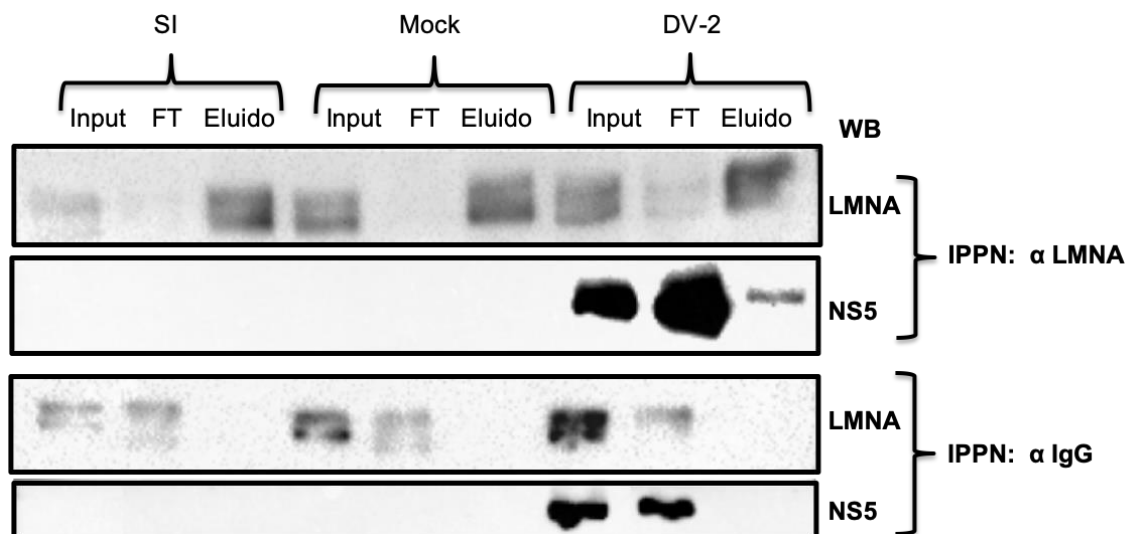


Figura 12. Análisis de las fracciones nucleares inmunoprecipitadas con un anticuerpo específico contra LMNA

Células Vero sin infectar, tratadas con el virus inactivo, e infectadas con DENV-2, fueron fraccionadas en extractos celulares y nucleares; esta última fracción se inmunoprecipitó con un anticuerpo comercial contra LMNA. El producto de la inmunoprecipitación se corrió en un gel de SDS-PAGE, y posteriormente se realizó un WB, el cual se reveló con un anticuerpo específico contra NS5. Se observa la presencia de NS5 en los eluatos de las células infectadas e inmunoprecipitadas con anti-LMNA.

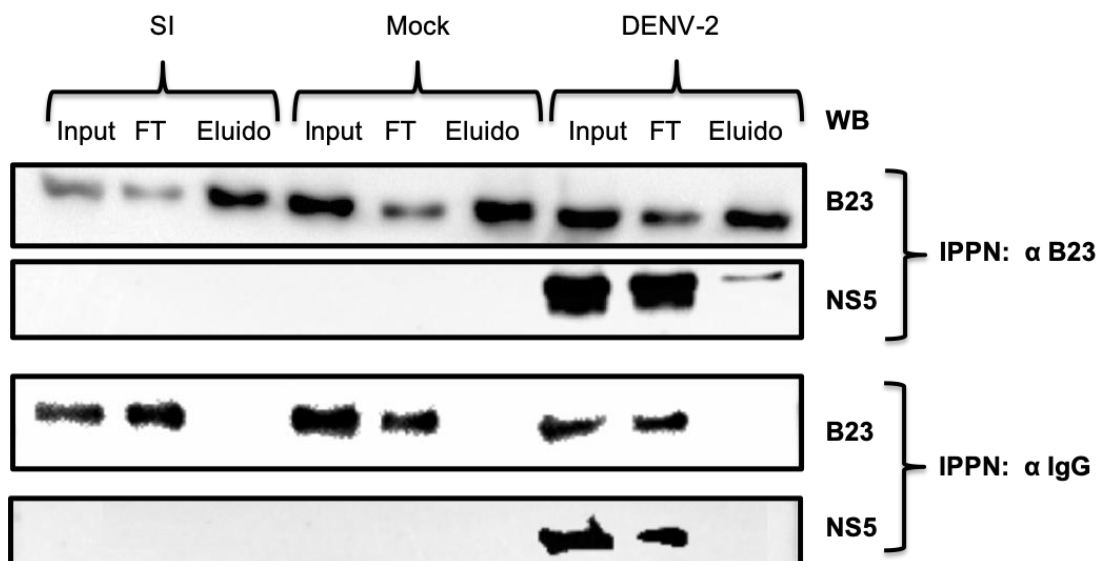


Figura 13. Análisis de las fracciones nucleares inmunoprecipitadas con un anticuerpo específico contra B23

Células Vero sin infectar, tratadas con el virus inactivo, e infectadas con DENV-2, fueron fraccionadas en extractos celulares y nucleares; esta última fracción se inmunoprecipitó con un anticuerpo comercial contra B23. El producto de la inmunoprecipitación se corrió en un gel de SDS-PAGE, y posteriormente se realizó un WB, el cual se reveló con un anticuerpo específico contra NS5. Se observa la presencia de NS5 en los eluatos de las células infectadas e inmunoprecipitadas con anti B23.

Para confirmar estas interacciones, realizamos un ensayo de espectrometría de masas de los lisados de las fracciones infectadas inmunoprecipitadas con anticuerpos contra B23. Los resultados confirmaron la presencia de la proteína NS5 en los eluatos, lo cual corrobora nuestra hipótesis de que NS5 forma un complejo con B23 en el núcleo de las células infectadas (Figura 14).

Proteins Detected						
N	Unused	Total	% Cov	Accession#	Name	Species
1	1.70	1.70	5.7	tr A7TUD3 ...	Genome polyprotein OS=Dengue virus 2 PE=1 SV=1	9FLAV

Figura 14. Resultados de la espectrometría de masas

Se reportó la presencia de la proteína NS5 con una cobertura del 5.7 %, lo que indica la presencia de NS5 en los eluatos inmunoprecipitados con el anticuerpo contra B23.

EFFECTO DEL KNOCKDOWN DE B23 SOBRE LA EXPRESIÓN DE NS5

Debido a que la presencia de LMNA/C es vital para la viabilidad celular, se investigó el efecto de inhibir la expresión de B23 con un siRNA diseñado específicamente para dicha molécula. Para tal efecto, las células Vero se transfectaron con siRNA con el propósito de inhibir la expresión de B23. Se realizó un ensayo de viabilidad celular utilizando un siRNA contra B23 (Figura 15) y se determinó que la célula permanece íntegra, aun en condiciones de inhibición total de B23.

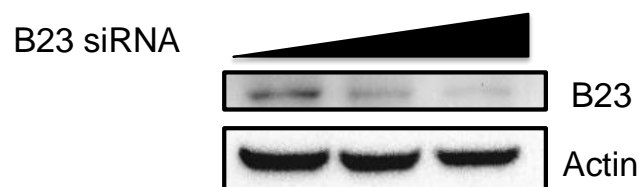


Figura 15. Ensayo de viabilidad celular

Utilizando cantidades ascendentes de siRNA contra B23, se analizó la viabilidad de las células, ocupando actina como control de integridad celular.

Las células Vero en placas de 6 pozos se transfectaron con las concentraciones de siRNA establecidas en la sección anterior. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se infectaron con 5 MOIs de DENV-2 y se analizaron a las 24 horas. La figura 16 muestra los resultados por inmunofluorescencia. Al utilizar siRNA contra

B23, se observó una ligera reducción en la expresión de B23 dentro del nucléolo a través de ensayos de inmunofluorescencia. Esta disminución en la expresión correlaciona con la disminución de NS5 en las células infectadas con el virus DEN-2 (Figura 16).

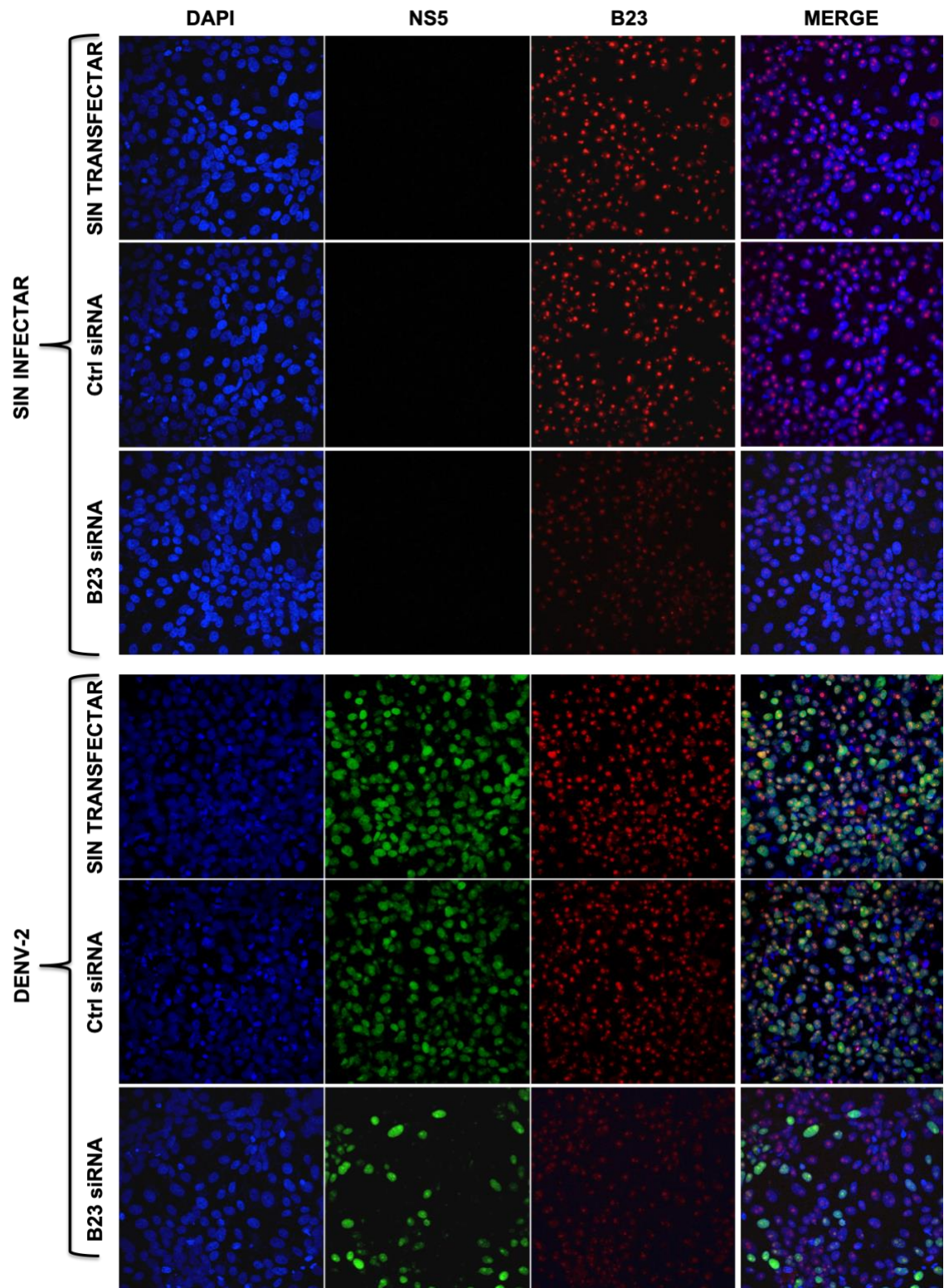


Figura 16. Inhibición de B23

Utilizando un siRNA contra B23, se utilizaron células sin infectar, tratadas con virus inactivo e infectadas con DENV-2. Se observa una reducción en la expresión de B23, al igual que una disminución en la expresión de NS5 en células infectadas.

Para tratar de evaluar el efecto del abatimiento de B23, se analizaron por Western Blot los lisados de las células tratadas con siRNA 24 horas postransfección. En la figura 17 se observa la reducción en la expresión de ambas proteínas en células transfectadas e infectadas (Figura 17) y en la figura 18 se observa un análisis densitométrico de la expresión de NS5 en presencia o ausencia del siRNA de B23.

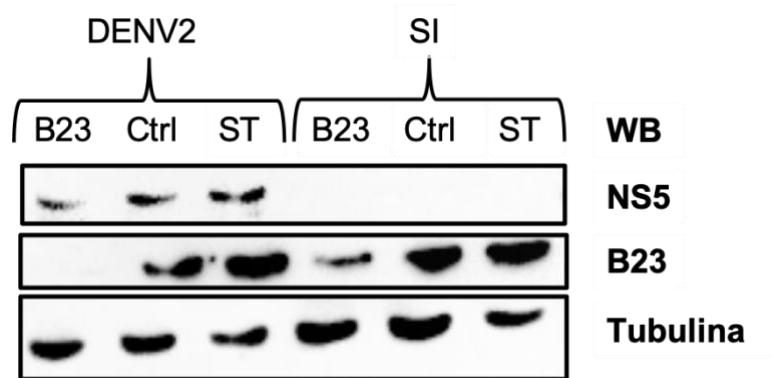


Figura 17. Evaluación de la expresión de B23 y NS5

Utilizando un siRNA contra B23, se utilizaron células sin infectar, tratadas con virus inactivo e infectadas con DENV-2. Se observa una reducción en la expresión de NS5 en las células infectadas y transfectadas.

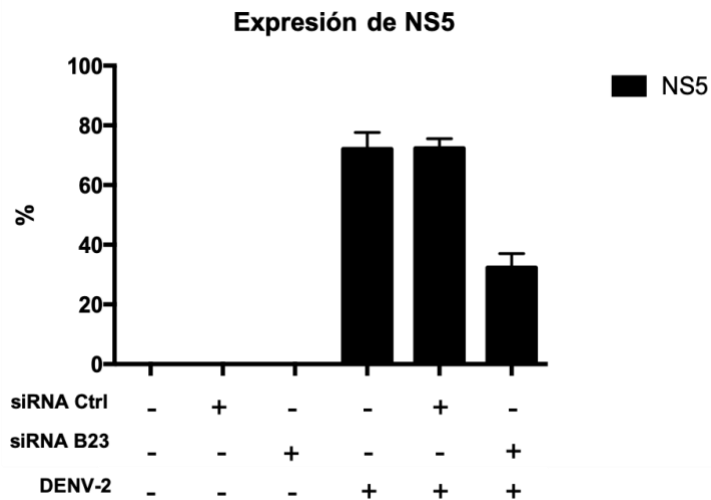


Figura 18. Evaluación de la expresión de NS5

Se realizó un análisis densitométrico de NS5. Se observa una reducción en la expresión de NS5 en las células infectadas y transfectadas.

EFFECTO DEL KNOCKDOWN DE B23 SOBRE LA REPLICACIÓN VIRAL

Para confirmar estos datos, realizamos ensayos de titulación por ensayo de placa utilizando sobrenadantes de células Vero sin infectar, tratadas con virus inactivo o infectadas en presencia o ausencia del siRNA contra B23 (Figura 19).

Observamos una diferencia entre las células transfectadas y no transfectadas en el total de unidades formadoras de placa (PFU) a través del ensayo de titulación, lo que sugiere que B23 es necesaria para la replicación viral.

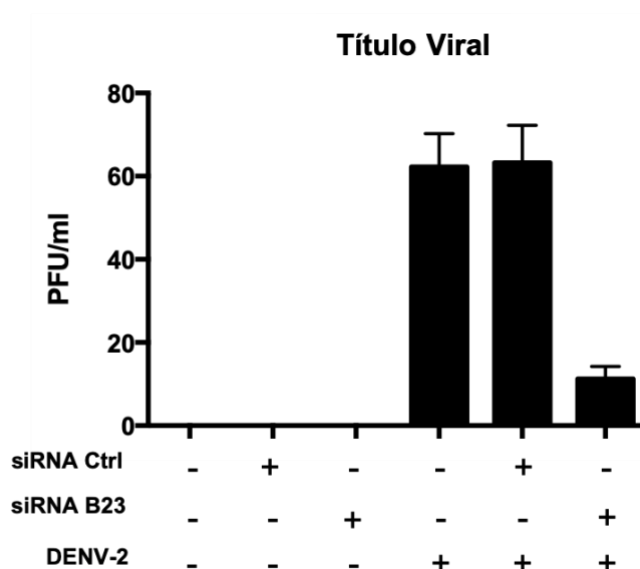


Figura 19. Evaluación del efecto de la disminución de la expresión de B23 sobre el título viral

Se evaluó el título viral en células Vero transfectadas con siRNA control o siRNA contra B23 o sin transfectar, en presencia o ausencia de DENV-2. La desviación estándar se debe a que el ensayo se realizó por triplicado.

ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE B23 Y LA PROTEÍNA NS5 DEL VIRUS DENGUE POR ENSAYOS DE DOCKING

Con la finalidad de determinar la regiones con la que se asocian las proteínas NS5 y B23, se llevaron a cabo ensayos de simulación por

docking, utilizando el modelo ya reportado de NS5 (Zhao, Soh et al. 2015) y 5 modelos de B23 generados a través del programa I-TASSER (Yang, Yan et al. 2015). Se utilizó el programa Modeller (Webb and Sali 2017) para realizar el docking, obteniendo 150 modelos que muestran la interacción entre NS5 y B23 (Figura 20), 30 modelos del complejo por cada modelo de B23 generado en I-TASSER.

Los 150 modelos generados se corrieron en el programa PDBsum para determinar el número de residuos que se repitieran con mayor frecuencia en todos los modelos; se encontraron residuos repetidos de lisina y arginina en las mismas regiones de NS5 (Figura 21), lo que sugiere que estos residuos podrían estar involucrados en la interacción de NS5 con B23. Debido al alto número de interacciones y el área de contacto, se puede concluir que las interacciones son reales.

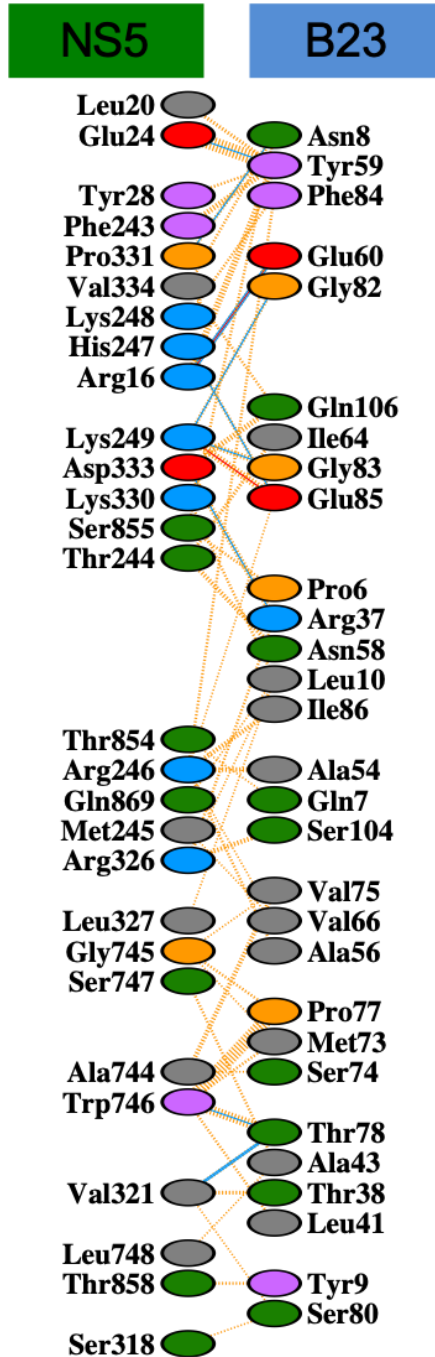


Figura 20. Evaluación de los residuos que participan en la interacción entre NS5 y B23

Se evaluaron 150 modelos similares a este y se analizó el número de veces que un residuo aparecía repetido. Los diferentes colores representan los diferentes tipos de aminoácidos.

Residuos Repetidos de NS5 en los 150 modelos									
1	R	2	R	3	R	4	R	5	R
R248	20	K466	20	F464	28	R248	23	K460	18
R247	19	F464	19	R248	28	R247	22	R248	18
M244	17	R248	21	R247	28	K466	22	R247	19
F464	17	R247	20	K466	27	M244	20	K466	17
						K460	20		

Tabla 3. Evaluación de los residuos de NS5 más sobrerrepresentados en los 150 modelos

Se obtuvieron 5 modelos de B23 a través del programa I-TASSER y se seleccionó un modelo de NS5. Se corrieron los modelos en el programa ClusPro y se obtuvieron 150 modelos, 30 modelos por cada modelo de B23. En verde oscuro se muestran los residuos compartidos mayormente entre los 30 complejos de cada modelo de B23.

DISCUSIÓN

La proteína NS5 es la proteína más grande y mejor conservada entre los 4 serotipos del virus del dengue (DENV-1-4). Esta proteína está formada por dos dominios estructurales con características globulares unidos por una pequeña secuencia de aminoácidos. Estos dos dominios tienen funciones únicas e independientes. El dominio N-terminal presenta actividad de metil-transferasa (MTasa) (Koonin 1993) y guanilil-transferasa (GTasa) (Issur, Geiss et al. 2009); ambas actividades están involucradas en la formación del cap viral; mientras que en el dominio C-terminal se encuentra la actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) (Ackermann and Padmanabhan 2001). A pesar de que se han determinado las estructuras cristalográficas de ambos dominios de la proteína NS5 (Zhao, Soh et al. 2015), aún existen muchos aspectos por elucidar, tales como las interacciones entre la proteína viral NS5 y las proteínas del huésped, y los mecanismos por los cuales el virus DEN manipula los procesos celulares que conducen a la patogénesis, así como proponer estrategias para el desarrollo de fármacos contra esta familia de virus.

La proteína NS5, es fundamental para el ciclo de replicación de los flavivirus, ya que, se ha demostrado que NS3 y NS5 interactúan en el citoplasma para formar parte del complejo replicativo en las células infectadas (Kapoor, Zhang et al. 1995). Esta interacción proteína-proteína se produce entre la región carboxilo-terminal de NS3 (aminoácidos 303-618) y la región N-terminal del dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA de NS5 (aminoácidos 320-368) (Johansson, Brooks et al. 2001). Sin embargo, varios autores hemos reportado la localización nuclear de la proteína NS5, no solo en ciertos serotipos de DENV, sino también en otros flavivirus. Datos de otros grupos y de nuestro laboratorio revelan que las proteínas NS5 de DENV-2 y DENV-3 se localizan principalmente en el núcleo de células infectadas, mientras que las proteínas NS5 de DENV-1 y DENV-4 son estrictamente citoplásmicas, ya que se ha descrito

que estas proteínas no presentan secuencias de localización nuclear funcionales (Hannemann, Sung et al. 2013). Como ya se mencionó previamente, la localización nuclear de NS5 no es exclusiva de DENV, ya que se ha observado que en JEV y YFV, NS5 se localiza en el núcleo de células infectadas, mientras que en WNV y KUN, esta proteína no ingresa al núcleo (Buckley, Gaidamovich et al. 1992, Uchil, Kumar et al. 2006, Mackenzie, Kenney et al. 2007). A diferencia de los virus de DNA, la mayoría de los virus de RNA replica en el citoplasma de las células infectadas y no requiere de la maquinaria nuclear para llevar a cabo la replicación del genoma viral. Aunado a esto, se ha observado que al inhibir la exportación nuclear de NS5 con leptomicina B, un inhibidor de la exportina CRM-1, encargada de exportar a NS5 al citoplasma, la replicación de DENV-2 no se ve afectada de gran manera, lo cual sugiere que la localización nuclear de NS5 no está directamente relacionada con la replicación del genoma viral (Rawlinson, Pryor et al. 2009).

El objetivo de este trabajo parte de la observación de que una gran cantidad de la proteína NS5 se encuentra en el nucléolo de las células infectadas, por lo que buscamos interacciones entre la proteína NS5 y proteínas nucleares o nucleolares que pudieran proveer información sobre la función que la proteína NS5 pudiera estar llevando a cabo en el núcleo de las células infectadas.

En un trabajo previo de nuestro grupo, observamos colocalización entre NS5 de DENV-2 y la proteína nuclear, LMNA/C, una proteína estructural involucrada en la formación de la lámina nuclear (Garcia-Cordero, Carrillo-Halfon et al. 2014). Esta proteína está asociada tanto a replicación como a la transcripción en las células y puede unirse al DNA de manera directa. Se ha reportado que la proteína nuclear, LMNA/C interactúa con proteínas de virus de DNA, como herpesvirus, citomegalovirus (CMV) y HIV-1 (Coffinier, Hudon et al. 2007, Sharma, Kamil et al. 2014, Wu, Pan et al. 2016), pero existen pocos reportes de su interacción con proteínas de virus de RNA. Es claro que los virus de RNA secuestran un número considerable de factores del huésped para llevar a cabo los procesos

necesarios para la replicación. Esto generalmente se logra a través de interacciones físicas entre las proteínas virales y del huésped (Mairiang, Zhang et al. 2013).

Un interactoma de NS5 y NS3 reportado por Le Breton y colaboradores describió la presencia de la proteína LMNA, sugiriendo su interacción con NS5 o con el complejo replicativo formado por NS3 y NS5 (Le Breton, Meyniel-Schicklin et al. 2011).

Al evaluar la colocalización entre LMNA/C y NS5 de DENV-2, observamos un índice de correlación de Pearson de 0.72.

Los interactomas de NS5 que se han reportado, reiteradamente muestran que la proteína NS5 se asocia con la proteína viral NS3, así como con varias proteínas involucradas en la regulación de la respuesta inmune (Le Breton, Meyniel-Schicklin et al. 2011, De Maio, Risso et al. 2016).

Se han reportado varias interacciones de la proteína NS5 con proteínas del huésped como La (Yocupicio-Monroy, Padmanabhan et al. 2007), PTB (De Nova-Ocampo, Villegas-Sepulveda et al. 2002), TYK2, IFNAR2 (Best, Morris et al. 2005), así como interacciones con proteínas del vector como iNOS (Mairiang, Zhang et al. 2013), y se ha observado que al hacer un knockdown de algunas de estas proteínas, la replicación se ve reducida. Diferentes análisis del interactoma de la proteína NS5, han revelado que NS5 inhibe a STAT2 (Ashour, Laurent-Rolle et al. 2009). Recientemente se demostró que tanto la proteína NS5 de DENV y ZIKV antagonizan la señalización de interferón (IFN) a través de la degradación de STAT2 (Grant, Ponia et al. 2016).

Interesantemente, en 2016, De Maio y colaboradores reportaron la presencia de la proteína B23, una proteína nucleolar, en los resultados del ensayo de proteómica. De igual manera, reportaron la interacción de NS5 con componentes de la maquinaria de splicing, específicamente con proteínas del complejo de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares U5, observando que la infección viral reduce la eficiencia de splicing,

disruptiendo la eficiencia del procesamiento del pre-mRNA (De Maio, Risso et al. 2016).

De igual manera, en varias imágenes de inmunofluorescencia observamos un enriquecimiento de NS5 en el nucléolo de las células infectadas. Esto nos sugirió que NS5 podría estar ingresando al nucléolo para interactuar con proteínas involucradas en la transcripción celular. Seleccionamos a la proteína B23 o nucleofosmina como marcador nucleolar y evaluar la presencia de NS5 en este compartimento. La proteína B23 posee funciones de RNAsa y endoribonucleasa, uniéndose de manera preferencial a ssRNA y dsRNA. B23 está involucrada en el ensamblaje de los ribosomas, donde es necesaria para el procesamiento eficiente del rRNA. También se ha reportado su interacción con proteínas del huso mitótico, uniéndose a centrosomas sin duplicar para promover su duplicación (Gjerset 2006).

Al evaluar la colocalización entre B23 y NS5 de DENV-2, observamos colocalización, con un índice de correlación de Pearson de 0.67, lo cual nos sugirió que estas dos proteínas podrían estar cercanas.

Para poder evaluar la interacción entre estas proteínas nucleares y NS5, se analizaron lisados citoplásmicos, nucleares y totales para corroborar la presencia de las proteínas LMNA/C y B23 en el compartimento nuclear. Una vez que se determinó que los lisados nucleares estaban puros, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando los anticuerpos comerciales anti LMNA/C y anti-B23 para bajar los complejos. Se utilizó el anticuerpo contra NS5 desarrollado en nuestro laboratorio (García-Cordero, Carrillo-Halfon et al. 2014) para revelar y observamos la presencia de NS5 en los lisados inmunoprecipitados tanto con anti LMNA/C como con anti B23, sugiriendo que estas proteínas están formando complejos con NS5.

Para confirmar estos datos, se realizó un ensayo de espectrometría de masas de los lisados de la fracciones nucleares infectadas e

inmunoprecipitadas con anticuerpos contra B23. Al analizar los resultados, se encontró la presencia de NS5 en los eluatos, corroborando nuestra hipótesis.

Dado que la principal función de LMNA/C es la de mantener la estructura de la envoltura nuclear y la posición de los poros nucleares, así como servir de anclaje y soporte para la cromatina, es considerada una plataforma estructural que conecta el núcleo al citoesqueleto de la célula, por lo que es de gran importancia en la actividad de proteínas que regulan la replicación del DNA, transcripción y regulación del ciclo celular (de Leeuw, Gruenbaum et al. 2018). Debido a que la ausencia de LMNA/C es letal para la viabilidad celular, no pudimos evaluar el efecto de inhibir esta proteína sobre la expresión de NS5.

Al realizar ensayos de viabilidad de B23, encontramos que esta proteína puede ser inhibida sin tener efectos significativos sobre la viabilidad celular, por lo tanto decidimos inhibir la expresión de esta proteína para evaluar sus efectos sobre la expresión de NS5. Para tal efecto se emplearon dos estrategias diferentes, usando la tecnología de CRISPR, la cual no fue exitosa; la otra estrategia fue silenciar con siRNAs diseñados específicamente contra ambas isoformas de B23. Al realizar ensayos de inmunofluorescencia, se observó la disminución en la expresión de NS5 en células infectadas y transfectadas con los siRNAs contra B23. De igual manera, se observó esta disminución por Western Blot, sugiriendo que la expresión de B23 es importante para la expresión de NS5. Al evaluar el sobrenadante de células infectadas y transfectadas, se observó una disminución en el título viral, sugiriendo la importancia de B23 para la replicación viral.

La proteína LMNA/C es una proteína del citoesqueleto de tipo V, proteínas de filamentos intermedios, involucrada en la formación de la lámina nuclear. La lámina nuclear es la interfaz molecular entre la membrana interna de la envoltura nuclear y los dominios periféricos de cromatina. LMNA/C es una proteína multifuncional involucrada en varios

procesos de la biología celular. Además de darle soporte estructural a la membrana nuclear, esta proteína está involucrada en eventos como síntesis de DNA, reparación de DNA, ensamblaje del huso mitótico, proliferación celular y senescencia, así como dar soporte a los poros nucleares (de Leeuw, Gruenbaum et al. 2018). Hasta el momento no se han reportado interacciones entre LMNA/C y proteínas de virus de RNA, sin embargo, en el caso de los virus de DNA, existen reportes de proteínas virales que forman complejos con LMNA/C para utilizar a la lámina nuclear como andamiaje para los genomas de DNA. Este es el caso de la proteína UL97 del citomegalovirus humano (HCMV), la cual es capaz de fosforilar a la LMNA/C, evento que promueve la disrupción de la lámina nuclear y el egreso del complejo de egreso nuclear (NEC) (Sharma, Kamil et al. 2014). LMNA/C también está involucrada en activación de genes y regulación de la heterocromatina. Otro virus de DNA, herpesvirus, (HSV) se ha observado que interacciona con la lámina nuclear. Se observó que en fibroblastos infectados con HSV y transfectados con mutantes negativas de LMNA, hubo una reducción en la expresión viral, replicación de DNA y crecimiento celular (Wu, Pan et al. 2016).

Se ha descrito la interacción de proteínas del citoesqueleto y proteínas flavivirales durante los procesos de ingreso, ensamblaje y egreso (Foo and Chee 2015). Una de estas proteínas es la vimentina, una proteína perteneciente al grupo de filamentos intermedios, al igual que las laminas. La vimentina sufre un rearrreglo durante la infección con DENV, e interactúa con la proteína NS4A para regular la formación del complejo replicativo de DENV (Chen, Gao et al. 2008). Asimismo, se ha observado la interacción de la proteína NS1 con vimentina para promover la replicación viral y la liberación del virión maduro (Foo and Chee 2015).

Esta asociación entre vimentina y proteínas de DENV sugieren la importancia del citoesqueleto durante la infección viral y podrían darnos un indicio sobre la naturaleza de la interacción entre LMNA/C y DENV.

NS5 podría estar formando complejos con LMNA/C para regular la heterocromatina y desactivar ciertos genes involucrados en la respuesta inmune.

Al igual que con NS5, se han reportado interactomas de proteínas virales donde se ha encontrado la presencia de B23. Este es el caso del virus de Chikungunya (CHIKV). Al realizar ensayos proteómicos de la línea celular astrocítica humana U-87 MG infectada con CHIKV, se observó la presencia de B23, y al utilizar un inhibidor de B23, se observó un aumento en la replicación viral, lo cual sugiere que B23 juega un papel importante en la regulación de la replicación de CHIKV (Thomas, Rai et al. 2013).

Por otra parte, B23 también es una proteína multifuncional. Se ha descrito su participación en eventos como transcripción de RNA Pol II, duplicación de centrosomas y como promotor o supresor de tumor dependiendo de sus niveles de expresión. Cuando B23 se une a ARF, inhibidor de la ubiquitín ligasa MDM2, esta última se une a p53, promoviendo su degradación (Itahana, Bhat et al. 2003). El complejo CDK2/ciclina E fosforila a B23, promoviendo la duplicación de los centrosomas; al inhibir la fosforilación de B23, los centrosomas no pueden duplicarse (Gjerset 2006).

Existen varios reportes de interacciones entre B23 y proteínas de virus de RNA, uno de ellos, con flavivirus. Se ha reportado la asociación de la proteína de cápside de JEV y B23 en el nucléolo de células infectadas y se observó que al inhibir a B23, la replicación de JEV disminuye significativamente, lo cual sugiere que B23 está involucrada en el ensamblaje de la partícula viral. Se ha reportado la interacción de la proteína de cápside del virus del dengue (DENV) con el nucléolo pero no se ha encontrado asociación con B23 (Tsuda, Mori et al. 2006). De igual manera, se ha reportado la interacción entre B23 y la proteína core del virus de hepatitis C (HCV). Durante la infección con HCV, la proteína core se localiza tanto en citoplasma como en núcleo. Se ha sugerido que en el nucléolo, la proteína core podría estimular la transcripción mediada por la

RNA polimerasa I (RNA Pol I) y secuestrar la biogénesis ribosomal, lo cual demostraría el crecimiento y proliferación celulares por la infección con HCV. La proteína core forma un complejo de activación transcripcional con el factor de transcripción YY1 y la acetiltransferasa de histonas (HAT); este complejo promotor se une a la región promotora del gen de B23 y aumenta la expresión de este gen (Mai, Yeh et al. 2006).

Debido a las múltiples funciones de B23, podemos hipotetizar que NS5 se asocia a esta proteína para evitar la duplicación de centrosomas y la subsiguiente división celular para promover una mayor replicación viral. Por otro lado, la proteína NS5 podría estar asociándose a B23 para promover un aumento en la biogénesis ribosomal, al igual que lo hace la proteína core de HCV. Se ha reportado que B23 posee dos regiones cargadas negativamente, las cuales son importantes para asociarse a regiones cargadas positivamente en proteínas del huésped o virales, incluyendo motivos ricos en arginina (ARM) y otras secuencias de localización nuclear. A través de ensayos de docking, encontramos una región sobrerrepresentada en los 150 modelos obtenidos, la cual es rica en argininas y podría ser el sitio de unión de NS5 a B23. Este región se encuentra en el dominio de metiltransferasa de NS5. Otro ensayo de docking molecular sugiere el uso de inhibidores específicos contra el dominio de metiltransferasa como blanco terapéutico (Kausar, Ali et al. 2019). El posible sitio de unión de B23 a NS5 podría encontrarse en esta región.

Aún faltan muchos detalles por elucidar sobre la proteína NS5, incluyendo otras posibles interacciones con proteínas nucleares y sus posibles funciones.

CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue evaluar las interacciones entre la proteína NS5 de DENV-2 y proteínas nucleares y nucleolares. Encontramos que NS5 forma complejos con LMNA/C y B23 a través de análisis bioquímicos como inmunoprecipitación y espectrometría de masas. Además, encontramos que al inhibir a B23, la expresión de NS5 se ve disminuida tanto en ensayos de inmunofluorescencia como en ensayos de Western Blot. Aunado a esto, al realizar ensayos de titulación de los sobrenadantes infectados y transfectados con el siRNA contra B23, observamos una disminución significativa en el título viral, sugiriendo que la interacción de NS5 con B23 es importante para la replicación viral. Para intentar discernir la región de NS5 que podría estar interaccionando con B23, realizamos ensayos de docking utilizando los modelos ya reportados de NS5 y haciendo modelos tridimensionales a través de varios programas computacionales. Encontramos una región en el dominio de metiltransferasa, que podría estar involucrado en esta interacción, ya que varios residuos de esta región aparecen repetidos a lo largo de los 150 modelos analizados.

PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de la interacción entre LMNA y NS5.
- A partir de los datos obtenidos por el ensayo de docking, mutar los residuos más sobrerrepresentados para evaluar el efecto sobre la interacción entre NS5 y B23.
- Confirmar por ensayos de Biacore la interacción de B23 y la proteína NS5 y evaluar si la sobreexpresión de B23 afecta a la replicación de manera positiva.

REFERENCIAS

- Ackermann, M. and R. Padmanabhan (2001). "De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase." J Biol Chem **276**(43): 39926-39937.
- Ashour, J., M. Laurent-Rolle, P. Y. Shi and A. Garcia-Sastre (2009). "NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation." J Virol **83**(11): 5408-5418.
- Bartelma, G. and R. Padmanabhan (2002). "Expression, purification, and characterization of the RNA 5'-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3." Virology **299**(1): 122-132.
- Bartenschlager, R. and S. Miller (2008). "Molecular aspects of Dengue virus replication." Future Microbiol **3**(2): 155-165.
- Bartholomeusz, A. I. and P. J. Wright (1993). "Synthesis of dengue virus RNA in vitro: initiation and the involvement of proteins NS3 and NS5." Arch Virol **128**(1-2): 111-121.
- Benarroch, D., M. P. Egloff, L. Mulard, C. Guerreiro, J. L. Romette and B. Canard (2004). "A structural basis for the inhibition of the NS5 dengue virus mRNA 2'-O-methyltransferase domain by ribavirin 5'-triphosphate." J Biol Chem **279**(34): 35638-35643.
- Benarroch, D., B. Selisko, G. A. Locatelli, G. Maga, J. L. Romette and B. Canard (2004). "The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core." Virology **328**(2): 208-218.
- Best, S. M., K. L. Morris, J. G. Shannon, S. J. Robertson, D. N. Mitzel, G. S. Park, E. Boer, J. B. Wolfenbarger and M. E. Bloom (2005). "Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist." J Virol **79**(20): 12828-12839.
- Bhattacharya, D., S. Hoover, S. P. Falk, B. Weisblum, M. Vestling and R. Striker (2008). "Phosphorylation of yellow fever virus NS5 alters methyltransferase activity." Virology **380**(2): 276-284.
- Bosch, I., K. Khaja, L. Estevez, G. Raines, H. Melichar, R. V. Warke, M. V. Fournier, F. A. Ennis and A. L. Rothman (2002). "Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge." J Virol **76**(11): 5588-5597.
- Bressanelli, S., L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R. L. Vitale, M. Mathieu, R. De Francesco and F. A. Rey (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13034-13039.
- Brooks, A. J., M. Johansson, A. V. John, Y. Xu, D. A. Jans and S. G. Vasudevan (2002). "The interdomain region of dengue NS5 protein that binds to the viral helicase NS3 contains independently functional importin beta 1 and importin alpha/beta-recognized nuclear localization signals." J Biol Chem **277**(39): 36399-36407.

Chambers, T. J., D. W. McCourt and C. M. Rice (1989). "Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis." Virology **169**(1): 100-109.

Colpitts, T. M., S. Barthel, P. Wang and E. Fikrig (2011). "Dengue virus capsid protein binds core histones and inhibits nucleosome formation in human liver cells." PLoS One **6**(9): e24365.

Davidson, A. D. (2009). "Chapter 2. New insights into flavivirus nonstructural protein 5." Adv Virus Res **74**: 41-101.

De Maio, F. A., G. Risso, N. G. Iglesias, P. Shah, B. Pozzi, L. G. Gebhard, P. Mammi, E. Mancini, M. J. Yanovsky, R. Andino, N. Krogan, A. Srebrow and A. V. Gamarnik (2016). "The Dengue Virus NS5 Protein Intrudes in the Cellular Spliceosome and Modulates Splicing." PLoS Pathog **12**(8): e1005841.

Dong, H., D. Ray, S. Ren, B. Zhang, F. Puig-Basagoiti, Y. Takagi, C. K. Ho, H. Li and P. Y. Shi (2007). "Distinct RNA elements confer specificity to flavivirus RNA cap methylation events." J Virol **81**(9): 4412-4421.

Dreuillet, C., J. Tillit, M. Kress and M. Ernault-Lange (2002). "In vivo and in vitro interaction between human transcription factor MOK2 and nuclear lamin A/C." Nucleic Acids Res **30**(21): 4634-4642.

Egloff, M. P., D. Benarroch, B. Selisko, J. L. Romette and B. Canard (2002). "An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization." EMBO J **21**(11): 2757-2768.

Egloff, M. P., E. Decroly, H. Malet, B. Selisko, D. Benarroch, F. Ferron and B. Canard (2007). "Structural and functional analysis of methylation and 5'-RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5." J Mol Biol **372**(3): 723-736.

Falgout, B., M. Pethel, Y. M. Zhang and C. J. Lai (1991). "Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins." J Virol **65**(5): 2467-2475.

Ferrer-Orta, C., A. Arias, C. Escarmis and N. Verdaguer (2006). "A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases." Curr Opin Struct Biol **16**(1): 27-34.

Filomatori, C. V., M. F. Lodeiro, D. E. Alvarez, M. M. Samsa, L. Pietrasanta and A. V. Gamarnik (2006). "A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome." Genes Dev **20**(16): 2238-2249.

Flamand, M., F. Megret, M. Mathieu, J. Lepault, F. A. Rey and V. Deubel (1999). "Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion." J Virol **73**(7): 6104-6110.

Forwood, J. K., A. Brooks, L. J. Briggs, C. Y. Xiao, D. A. Jans and S. G. Vasudevan (1999). "The 37-amino-acid interdomain of dengue virus NS5 protein contains a functional NLS and inhibitory CK2 site." Biochem Biophys Res Commun **257**(3): 731-737.

Garcia-Montalvo, B. M., F. Medina and R. M. del Angel (2004). "La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA." Virus Res **102**(2): 141-150.

Gebhard, L. G., C. V. Filomatori and A. V. Gamarnik (2011). "Functional RNA elements in the dengue virus genome." Viruses **3**(9): 1739-1756.

Geneva, W. (1997). "Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control." World Health Organization.

Hannemann, H., P. Y. Sung, H. C. Chiu, A. Yousuf, J. Bird, S. P. Lim and A. D. Davidson (2013). "Serotype-specific differences in dengue virus non-structural protein 5 nuclear localization." J Biol Chem **288**(31): 22621-22635.

Heinz, F. X. and S. L. Allison (2003). "Flavivirus structure and membrane fusion." Adv Virus Res **59**: 63-97.

Issur, M., B. J. Geiss, I. Bougie, F. Picard-Jean, S. Despins, J. Mayette, S. E. Hobdey and M. Bisailon (2009). "The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure." RNA **15**(12): 2340-2350.

Jakubiec, A. and I. Jupin (2007). "Regulation of positive-strand RNA virus replication: the emerging role of phosphorylation." Virus Res **129**(2): 73-79.

Johansson, M., A. J. Brooks, D. A. Jans and S. G. Vasudevan (2001). "A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3." J Gen Virol **82**(Pt 4): 735-745.

Kapoor, M., L. Zhang, M. Ramachandra, J. Kusakawa, K. E. Ebner and R. Padmanabhan (1995). "Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5." J Biol Chem **270**(32): 19100-19106.

Khadka, S., A. D. Vangeloff, C. Zhang, P. Siddavatam, N. S. Heaton, L. Wang, R. Sengupta, S. Sahasrabudhe, G. Randall, M. Gribskov, R. J. Kuhn, R. Perera and D. J. LaCount (2011). "A physical interaction network of dengue virus and human proteins." Mol Cell Proteomics **10**(12): M111012187.

Koonin, E. V. (1991). "The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses." J Gen Virol **72** (Pt 9): 2197-2206.

Koonin, E. V. (1993). "Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus." J Gen Virol **74** (Pt 4): 733-740.

Kroschewski, H., S. P. Lim, R. E. Butcher, T. L. Yap, J. Lescar, P. J. Wright, S. G. Vasudevan and A. D. Davidson (2008). "Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS5 methyltransferase domain." J Biol Chem **283**(28): 19410-19421.

Kuhn, R. J., W. Zhang, M. G. Rossmann, S. V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C. T. Jones, S. Mukhopadhyay, P. R. Chipman, E. G. Strauss, T. S. Baker and J. H. Strauss (2002). "Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion." Cell **108**(5): 717-725.

Kumar, A., S. Buhler, B. Selisko, A. Davidson, K. Mulder, B. Canard, S. Miller and R. Bartenschlager (2013). "Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 does not strictly correlate with efficient viral RNA replication and inhibition of type I interferon signaling." J Virol **87**(8): 4545-4557.

Kummerer, B. M. and C. M. Rice (2002). "Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles." J Virol **76**(10): 4773-4784.

Le Breton, M., L. Meyniel-Schicklin, A. Deloire, B. Coutard, B. Canard, X. de Lamballerie, P. Andre, C. Raboutin-Combe, V. Lotteau and N. Davoust (2011). "Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen." BMC Microbiol **11**: 234.

Lesburg, C. A., M. B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A. F. Mannarino and P. C. Weber (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site." Nat Struct Biol **6**(10): 937-943.

Leung, J. Y., G. P. Pijlman, N. Kondratieva, J. Hyde, J. M. Mackenzie and A. A. Khromykh (2008). "Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly." J Virol **82**(10): 4731-4741.

Liu, L., H. Dong, H. Chen, J. Zhang, H. Ling, Z. Li, P. Y. Shi and H. Li (2010). "Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition." Front Biol (Beijing) **5**(4): 286-303.

Luo, D., T. Xu, C. Hunke, G. Gruber, S. G. Vasudevan and J. Lescar (2008). "Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus." J Virol **82**(1): 173-183.

Mackenzie, J. M., M. K. Jones and P. R. Young (1996). "Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication." Virology **220**(1): 232-240.

Mackenzie, J. M., M. T. Kenney and E. G. Westaway (2007). "West Nile virus strain Kunjin NS5 polymerase is a phosphoprotein localized at the cytoplasmic site of viral RNA synthesis." J Gen Virol **88**(Pt 4): 1163-1168.

Mairiang, D., H. Zhang, A. Sodja, T. Murali, P. Suriyaphol, P. Malasit, T. Limjindaporn and R. L. Finley, Jr. (2013). "Identification of new protein interactions between dengue fever virus and its hosts, human and mosquito." PLoS One **8**(1): e53535.

Malone, T., R. M. Blumenthal and X. Cheng (1995). "Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes." J Mol Biol **253**(4): 618-632.

Martin, J. L. and F. M. McMillan (2002). "SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold." Curr Opin Struct Biol **12**(6): 783-793.

Mazzon, M., M. Jones, A. Davidson, B. Chain and M. Jacobs (2009). "Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation." J Infect Dis **200**(8): 1261-1270.

McLean, J. E., A. Wudzinska, E. Datan, D. Quaglino and Z. Zakeri (2011). "Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication." J Biol Chem **286**(25): 22147-22159.

Medin, C. L., K. A. Fitzgerald and A. L. Rothman (2005). "Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion." J Virol **79**(17): 11053-11061.

Miller, S., S. Kastner, J. Krijnse-Locker, S. Buhler and R. Bartenschlager (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**(12): 8873-8882.

Modis, Y., S. Ogata, D. Clements and S. C. Harrison (2004). "Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion." Nature **427**(6972): 313-319.

Morrison, J., S. Aguirre and A. Fernandez-Sesma (2012). "Innate immunity evasion by Dengue virus." Viruses **4**(3): 397-413.

Munoz-Jordan, J. L., M. Laurent-Rolle, J. Ashour, L. Martinez-Sobrido, M. Ashok, W. I. Lipkin and A. Garcia-Sastre (2005). "Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses." J Virol **79**(13): 8004-8013.

Munoz-Jordan, J. L., G. G. Sanchez-Burgos, M. Laurent-Rolle and A. Garcia-Sastre (2003). "Inhibition of interferon signaling by dengue virus." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14333-14338.

Murray, N. E., M. B. Quam and A. Wilder-Smith (2013). "Epidemiology of dengue: past, present and future prospects." Clin Epidemiol **5**: 299-309.

Perera, R. and R. J. Kuhn (2008). "Structural proteomics of dengue virus." Curr Opin Microbiol **11**(4): 369-377.

Quintavalle, M., S. Sambucini, V. Summa, L. Orsatti, F. Talamo, R. De Francesco and P. Neddermann (2007). "Hepatitis C virus NS5A is a direct substrate of casein kinase I-alpha, a cellular kinase identified by inhibitor affinity chromatography using specific NS5A hyperphosphorylation inhibitors." J Biol Chem **282**(8): 5536-5544.

Raghupathy, R., U. C. Chaturvedi, H. Al-Sayer, E. A. Elbishbishi, R. Agarwal, R. Nagar, S. Kapoor, A. Misra, A. Mathur, H. Nusrat, F. Azizieh, M. A. Khan and A. S. Mustafa (1998). "Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever." J Med Virol **56**(3): 280-285.

Rawlinson, S. M., M. J. Pryor, P. J. Wright and D. A. Jans (2009). "CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production." J Biol Chem **284**(23): 15589-15597.

Ray, D., A. Shah, M. Tilgner, Y. Guo, Y. Zhao, H. Dong, T. S. Deas, Y. Zhou, H. Li and P. Y. Shi (2006). "West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5." J Virol **80**(17): 8362-8370.

Sangiambut, S., P. Keelapang, J. Aaskov, C. Puttikhunt, W. Kasinrerak, P. Malasit and N. Sittisombut (2008). "Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection." J Gen Virol **89**(Pt 5): 1254-1264.

Tan, B. H., J. Fu, R. J. Sugrue, E. H. Yap, Y. C. Chan and Y. H. Tan (1996). "Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in Escherichia coli exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity." Virology **216**(2): 317-325.

Tay, M. Y., J. E. Fraser, W. K. Chan, N. J. Moreland, A. P. Rathore, C. Wang, S. G. Vasudevan and D. A. Jans (2013). "Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1-4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin." Antiviral Res **99**(3): 301-306.

Tsuda, Y., Y. Mori, T. Abe, T. Yamashita, T. Okamoto, T. Ichimura, K. Moriishi and Y. Matsuura (2006). "Nucleolar protein B23 interacts with Japanese encephalitis virus core protein and participates in viral replication." Microbiol Immunol **50**(3): 225-234.

Uchil, P. D., A. V. Kumar and V. Satchidanandam (2006). "Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells." J Virol **80**(11): 5451-5464.

Westaway, E. G., A. A. Khromykh, M. T. Kenney, J. M. Mackenzie and M. K. Jones (1997). "Proteins C and NS4B of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus." Virology **234**(1): 31-41.

Westaway, E. G., J. M. Mackenzie and A. A. Khromykh (2002). "Replication and gene function in Kunjin virus." Curr Top Microbiol Immunol **267**: 323-351.

Yang, M. R., S. R. Lee, W. Oh, E. W. Lee, J. Y. Yeh, J. J. Nah, Y. S. Joo, J. Shin, H. W. Lee, S. Pyo and J. Song (2008). "West Nile virus capsid protein induces p53-mediated apoptosis via the sequestration of HDM2 to the nucleolus." Cell Microbiol **10**(1): 165-176.

Yap, T. L., T. Xu, Y. L. Chen, H. Malet, M. P. Egloff, B. Canard, S. G. Vasudevan and J. Lescar (2007). "Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution." J Virol **81**(9): 4753-4765.

Yocupicio-Monroy, M., R. Padmanabhan, F. Medina and R. M. del Angel (2007). "Mosquito La protein binds to the 3' untranslated region of the positive and negative polarity dengue virus RNAs and relocates to the cytoplasm of infected cells." Virology **357**(1): 29-40.

Yon, C., T. Teramoto, N. Mueller, J. Phelan, V. K. Ganesh, K. H. Murthy and R. Padmanabhan (2005). "Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase." J Biol Chem **280**(29): 27412-27419.

Yu, I. M., W. Zhang, H. A. Holdaway, L. Li, V. A. Kostyuchenko, P. R. Chipman, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann and J. Chen (2008). "Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation." Science **319**(5871): 1834-1837.

Zhou, Y., D. Ray, Y. Zhao, H. Dong, S. Ren, Z. Li, Y. Guo, K. A. Bernard, P. Y. Shi and H. Li (2007). "Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase." J Virol **81**(8): 3891-3903.

Ackermann, M. and R. Padmanabhan (2001). "De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase." J Biol Chem **276**(43): 39926-39937.

Aminev, A. G., S. P. Amineva and A. C. Palmenberg (2003). "Encephalomyocarditis viral protein 2A localizes to nucleoli and inhibits cap-dependent mRNA translation." Virus Res **95**(1-2): 45-57.

Andersen, J. S., C. E. Lyon, A. H. Fox, A. K. Leung, Y. W. Lam, H. Steen, M. Mann and A. I. Lamond (2002). "Directed proteomic analysis of the human nucleolus." Curr Biol **12**(1): 1-11.

Ashour, J., M. Laurent-Rolle, P. Y. Shi and A. Garcia-Sastre (2009). "NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation." J Virol **83**(11): 5408-5418.

Balinsky, C. A., H. Schmeisser, S. Ganesan, K. Singh, T. C. Pierson and K. C. Zoon (2013). "Nucleolin interacts with the dengue virus capsid protein and plays a role in formation of infectious virus particles." J Virol **87**(24): 13094-13106.

Bartelma, G. and R. Padmanabhan (2002). "Expression, purification, and characterization of the RNA 5'-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3." Virology **299**(1): 122-132.

Bartenschlager, R. and S. Miller (2008). "Molecular aspects of Dengue virus replication." Future Microbiol **3**(2): 155-165.

Bartholomeusz, A. I. and P. J. Wright (1993). "Synthesis of dengue virus RNA in vitro: initiation and the involvement of proteins NS3 and NS5." Arch Virol **128**(1-2): 111-121.

Benarroch, D., M. P. Egloff, L. Mulard, C. Guerreiro, J. L. Romette and B. Canard (2004). "A structural basis for the inhibition of the NS5 dengue virus mRNA 2'-O-methyltransferase domain by ribavirin 5'-triphosphate." J Biol Chem **279**(34): 35638-35643.

Benarroch, D., B. Selisko, G. A. Locatelli, G. Maga, J. L. Romette and B. Canard (2004). "The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core." Virology **328**(2): 208-218.

Best, S. M., K. L. Morris, J. G. Shannon, S. J. Robertson, D. N. Mitzel, G. S. Park, E. Boer, J. B. Wolfenbarger and M. E. Bloom (2005). "Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist." J Virol **79**(20): 12828-12839.

Bhattacharya, D., S. Hoover, S. P. Falk, B. Weisblum, M. Vestling and R. Striker (2008). "Phosphorylation of yellow fever virus NS5 alters methyltransferase activity." Virology **380**(2): 276-284.

Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, J. Navascues and A. I. Lamond (2007). "The multifunctional nucleolus." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 574-585.

Bosch, I., K. Khaja, L. Estevez, G. Raines, H. Melichar, R. V. Warke, M. V. Fournier, F. A. Ennis and A. L. Rothman (2002). "Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge." J Virol **76**(11): 5588-5597.

Box, J. K., N. Paquet, M. N. Adams, D. Boucher, E. Bolderson, K. J. O'Byrne and D. J. Richard (2016). "Nucleophosmin: from structure and function to disease development." BMC Mol Biol **17**(1): 19.

Bressanelli, S., L. Tomei, A. Roussel, I. Incitti, R. L. Vitale, M. Mathieu, R. De Francesco and F. A. Rey (1999). "Crystal structure of the RNA-

dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13034-13039.

Brooks, A. J., M. Johansson, A. V. John, Y. Xu, D. A. Jans and S. G. Vasudevan (2002). "The interdomain region of dengue NS5 protein that binds to the viral helicase NS3 contains independently functional importin beta 1 and importin alpha/beta-recognized nuclear localization signals." J Biol Chem **277**(39): 36399-36407.

Buckley, A., S. Gaidamovich, A. Turchinskaya and E. A. Gould (1992). "Monoclonal antibodies identify the NS5 yellow fever virus non-structural protein in the nuclei of infected cells." J Gen Virol **73 (Pt 5)**: 1125-1130.

Buckley, A. and E. A. Gould (1988). "Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus." J Gen Virol **69 (Pt 8)**: 1913-1920.

Chambers, T. J., D. W. McCourt and C. M. Rice (1989). "Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis." Virology **169**(1): 100-109.

Chen, W., N. Gao, J. L. Wang, Y. P. Tian, Z. T. Chen and J. An (2008). "Vimentin is required for dengue virus serotype 2 infection but microtubules are not necessary for this process." Arch Virol **153**(9): 1777-1781.

Coffinier, C., S. E. Hudon, E. A. Farber, S. Y. Chang, C. A. Hrycyna, S. G. Young and L. G. Fong (2007). "HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(33): 13432-13437.

Colpitts, T. M., S. Barthel, P. Wang and E. Fikrig (2011). "Dengue virus capsid protein binds core histones and inhibits nucleosome formation in human liver cells." PLoS One **6**(9): e24365.

Davidson, A. D. (2009). "Chapter 2. New insights into flavivirus nonstructural protein 5." Adv Virus Res **74**: 41-101.

de Leeuw, R., Y. Gruenbaum and O. Medalia (2018). "Nuclear Lamins: Thin Filaments with Major Functions." Trends Cell Biol **28**(1): 34-45.

De Maio, F. A., G. Risso, N. G. Iglesias, P. Shah, B. Pozzi, L. G. Gebhard, P. Mammi, E. Mancini, M. J. Yanovsky, R. Andino, N. Krogan, A. Srebrow and A. V. Gamarnik (2016). "The Dengue Virus NS5 Protein Intrudes in the Cellular Spliceosome and Modulates Splicing." PLoS Pathog **12**(8): e1005841.

De Nova-Ocampo, M., N. Villegas-Sepulveda and R. M. del Angel (2002). "Translation elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA." Virology **295**(2): 337-347.

Dong, H., D. Ray, S. Ren, B. Zhang, F. Puig-Basagoiti, Y. Takagi, C. K. Ho, H. Li and P. Y. Shi (2007). "Distinct RNA elements confer specificity to flavivirus RNA cap methylation events." J Virol **81**(9): 4412-4421.

Dreuillet, C., J. Tillit, M. Kress and M. Ernoult-Lange (2002). "In vivo and in vitro interaction between human transcription factor MOK2 and nuclear lamin A/C." Nucleic Acids Res **30**(21): 4634-4642.

Egloff, M. P., D. Benarroch, B. Selisko, J. L. Romette and B. Canard (2002). "An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization." EMBO J **21**(11): 2757-2768.

Egloff, M. P., E. Decroly, H. Malet, B. Selisko, D. Benarroch, F. Ferron and B. Canard (2007). "Structural and functional analysis of methylation and 5'-RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5." J Mol Biol **372**(3): 723-736.

Falgout, B., M. Pethel, Y. M. Zhang and C. J. Lai (1991). "Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins." J Virol **65**(5): 2467-2475.

Ferrer-Orta, C., A. Arias, C. Escarmis and N. Verdaguer (2006). "A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases." Curr Opin Struct Biol **16**(1): 27-34.

Filomatori, C. V., M. F. Lodeiro, D. E. Alvarez, M. M. Samsa, L. Pietrasanta and A. V. Gamarnik (2006). "A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome." Genes Dev **20**(16): 2238-2249.

Flamand, M., F. Megret, M. Mathieu, J. Lepault, F. A. Rey and V. Deubel (1999). "Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion." J Virol **73**(7): 6104-6110.

Foo, K. Y. and H. Y. Chee (2015). "Interaction between Flavivirus and Cytoskeleton during Virus Replication." Biomed Res Int **2015**: 427814.

Forwood, J. K., A. Brooks, L. J. Briggs, C. Y. Xiao, D. A. Jans and S. G. Vasudevan (1999). "The 37-amino-acid interdomain of dengue virus NS5 protein contains a functional NLS and inhibitory CK2 site." Biochem Biophys Res Commun **257**(3): 731-737.

Funk, A., K. Truong, T. Nagasaki, S. Torres, N. Floden, E. Balmori Melian, J. Edmonds, H. Dong, P. Y. Shi and A. A. Khromykh (2010). "RNA structures required for production of subgenomic flavivirus RNA." J Virol **84**(21): 11407-11417.

Garcia-Cordero, J., S. Carrillo-Halfon, M. Leon-Juarez, H. Romero-Ramirez, P. Valenzuela-Leon, M. Lopez-Gonzalez, L. Santos-Argumedo, B. Gutierrez-Castaneda, Y. M. J. A. Gonzalez and L. Cedillo-Barron (2014). "Generation and characterization of a rat monoclonal antibody against the RNA polymerase protein from Dengue Virus-2." Immunol Invest **43**(1): 28-40.

Garcia-Montalvo, B. M., F. Medina and R. M. del Angel (2004). "La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA." Virus Res **102**(2): 141-150.

Gary W. Brunette, J. B. N. (2019). Centers for Disease Control and Prevention. CDC Yellow Book 2020: Health Information for International Travel. New York: Oxford University Press.

Gebhard, L. G., C. V. Filomatori and A. V. Gamarnik (2011). "Functional RNA elements in the dengue virus genome." Viruses **3**(9): 1739-1756.

Geneva, W. (1997). "Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control." World Health Organization.

Gjerset, R. A. (2006). "DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer." J Mol Histol **37**(5-7): 239-251.

Grant, A., S. S. Ponia, S. Tripathi, V. Balasubramaniam, L. Miorin, M. Sourisseau, M. C. Schwarz, M. P. Sanchez-Seco, M. J. Evans, S. M. Best and A. Garcia-Sastre (2016). "Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling." Cell Host Microbe **19**(6): 882-890.

Hannemann, H., P. Y. Sung, H. C. Chiu, A. Yousuf, J. Bird, S. P. Lim and A. D. Davidson (2013). "Serotype-specific differences in dengue virus non-structural protein 5 nuclear localization." J Biol Chem **288**(31): 22621-22635.

Heinz, F. X. and S. L. Allison (2003). "Flavivirus structure and membrane fusion." Adv Virus Res **59**: 63-97.

Hirano, M., S. Kaneko, T. Yamashita, H. Luo, W. Qin, Y. Shirota, T. Nomura, K. Kobayashi and S. Murakami (2003). "Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B." J Biol Chem **278**(7): 5109-5115.

Issur, M., B. J. Geiss, I. Bougie, F. Picard-Jean, S. Despins, J. Mayette, S. E. Hobdey and M. Bisailon (2009). "The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure." RNA **15**(12): 2340-2350.

Itahana, K., K. P. Bhat, A. Jin, Y. Itahana, D. Hawke, R. Kobayashi and Y. Zhang (2003). "Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation." Mol Cell **12**(5): 1151-1164.

Jakubiec, A. and I. Jupin (2007). "Regulation of positive-strand RNA virus replication: the emerging role of phosphorylation." Virus Res **129**(2): 73-79.

Jans, D. A. and A. J. Martin (2018). "Nucleocytoplasmic Trafficking of Dengue Non-structural Protein 5 as a Target for Antivirals." Adv Exp Med Biol **1062**: 199-213.

Johansson, M., A. J. Brooks, D. A. Jans and S. G. Vasudevan (2001). "A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3." J Gen Virol **82**(Pt 4): 735-745.

Kapoor, M., L. Zhang, M. Ramachandra, J. Kusakawa, K. E. Ebner and R. Padmanabhan (1995). "Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5." J Biol Chem **270**(32): 19100-19106.

Katrak, K., B. P. Mahon, W. C. Jones, S. Brautigam and K. H. Mills (1992). "Preparative separation of foreign antigens for highly efficient presentation to T cells in vitro." J Immunol Methods **156**(2): 247-254.

Kausar, M. A., A. Ali, S. Qiblawi, S. Shahid, M. A. Izhari and A. Saral (2019). "Molecular docking based design of Dengue NS5 methyltransferase inhibitors." Bioinformatics **15**(6): 394-401.

Khadka, S., A. D. Vangeloff, C. Zhang, P. Siddavatam, N. S. Heaton, L. Wang, R. Sengupta, S. Sahasrabudhe, G. Randall, M. Gribskov, R. J. Kuhn, R. Perera and D. J. LaCount (2011). "A physical interaction network of dengue virus and human proteins." Mol Cell Proteomics **10**(12): M111012187.

Koonin, E. V. (1991). "The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses." J Gen Virol **72 (Pt 9)**: 2197-2206.

Koonin, E. V. (1993). "Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus." J Gen Virol **74 (Pt 4)**: 733-740.

Kroschewski, H., S. P. Lim, R. E. Butcher, T. L. Yap, J. Lescar, P. J. Wright, S. G. Vasudevan and A. D. Davidson (2008). "Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS5 methyltransferase domain." J Biol Chem **283(28)**: 19410-19421.

Kuhn, R. J., W. Zhang, M. G. Rossmann, S. V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C. T. Jones, S. Mukhopadhyay, P. R. Chipman, E. G. Strauss, T. S. Baker and J. H. Strauss (2002). "Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion." Cell **108(5)**: 717-725.

Kumar, A., S. Buhler, B. Selisko, A. Davidson, K. Mulder, B. Canard, S. Miller and R. Bartenschlager (2013). "Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 does not strictly correlate with efficient viral RNA replication and inhibition of type I interferon signaling." J Virol **87(8)**: 4545-4557.

Kummerer, B. M. and C. M. Rice (2002). "Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles." J Virol **76(10)**: 4773-4784.

Kusakawa, T., T. Shimakami, S. Kaneko, K. Yoshioka and S. Murakami (2007). "Functional interaction of hepatitis C Virus NS5B with Nucleolin GAR domain." J Biochem **141(6)**: 917-927.

Le Breton, M., L. Meyniel-Schicklin, A. Deloire, B. Coutard, B. Canard, X. de Lamballerie, P. Andre, C. Roubourdin-Combe, V. Lotteau and N. Davoust (2011). "Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen." BMC Microbiol **11**: 234.

Lee, C., A. Levin and D. Branton (1987). "Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels." Anal Biochem **166(2)**: 308-312.

Leon-Juarez, M., J. Garcia-Cordero, L. Santos-Argumedo, H. Romero-Ramirez, J. Garcia-Machorro, J. Bustos-Arriaga, B. Gutierrez-Castaneda, N. V. Sepulveda, G. Mellado-Sanchez and L. Cedillo-Barron (2013). "Generation and characterization of a monoclonal antibody that cross-reacts with the envelope protein from the four dengue virus serotypes." APMIS **121(9)**: 848-858.

Leon-Juarez, M., M. Martinez-Castillo, G. Shrivastava, J. Garcia-Cordero, N. Villegas-Sepulveda, M. Mondragon-Castelan, R. Mondragon-Flores and L. Cedillo-Barron (2016). "Recombinant Dengue virus protein NS2B alters membrane permeability in different membrane models." Virology **13**: 1.

Lesburg, C. A., M. B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A. F. Mannarino and P. C. Weber (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site." Nat Struct Biol **6(10)**: 937-943.

Leung, J. Y., G. P. Pijlman, N. Kondratieva, J. Hyde, J. M. Mackenzie and A. A. Khromykh (2008). "Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly." J Virol **82**(10): 4731-4741.

Liu, L., H. Dong, H. Chen, J. Zhang, H. Ling, Z. Li, P. Y. Shi and H. Li (2010). "Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition." Front Biol (Beijing) **5**(4): 286-303.

Lobaina, Y. and Y. Perera (2019). "Implication of B23/NPM1 in Viral Infections, Potential Uses of B23/NPM1 Inhibitors as Antiviral Therapy." Infect Disord Drug Targets **19**(1): 2-16.

Luo, D., T. Xu, C. Hunke, G. Gruber, S. G. Vasudevan and J. Lescar (2008). "Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus." J Virol **82**(1): 173-183.

Mackenzie, J. M., M. T. Kenney and E. G. Westaway (2007). "West Nile virus strain Kunjin NS5 polymerase is a phosphoprotein localized at the cytoplasmic site of viral RNA synthesis." J Gen Virol **88**(Pt 4): 1163-1168.

Mai, R. T., T. S. Yeh, C. F. Kao, S. K. Sun, H. H. Huang and Y. H. Wu Lee (2006). "Hepatitis C virus core protein recruits nucleolar phosphoprotein B23 and coactivator p300 to relieve the repression effect of transcriptional factor YY1 on B23 gene expression." Oncogene **25**(3): 448-462.

Mai, W., F. Huang, H. Chen, Y. Zhou and Y. Chen (2017). "Nervous necrosis virus capsid protein exploits nucleolar phosphoprotein Nucleophosmin (B23) function for viral replication." Virus Res **230**: 1-6.

Mairiang, D., H. Zhang, A. Sodja, T. Murali, P. Suriyaphol, P. Malasit, T. Limjindaporn and R. L. Finley, Jr. (2013). "Identification of new protein interactions between dengue fever virus and its hosts, human and mosquito." PLoS One **8**(1): e53535.

Malone, T., R. M. Blumenthal and X. Cheng (1995). "Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes." J Mol Biol **253**(4): 618-632.

Martin, J. L. and F. M. McMillan (2002). "SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold." Curr Opin Struct Biol **12**(6): 783-793.

Matsumura, T., V. Stollar and R. W. Schlesinger (1971). "Studies on the nature of dengue viruses. V. Structure and development of dengue virus in Vero cells." Virology **46**(2): 344-355.

Mazzon, M., M. Jones, A. Davidson, B. Chain and M. Jacobs (2009). "Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation." J Infect Dis **200**(8): 1261-1270.

McLean, J. E., A. Wudzinska, E. Datan, D. Quaglino and Z. Zakeri (2011). "Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication." J Biol Chem **286**(25): 22147-22159.

Medin, C. L., K. A. Fitzgerald and A. L. Rothman (2005). "Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion." J Virol **79**(17): 11053-11061.

Miller, S., S. Kastner, J. Krijnse-Locker, S. Buhler and R. Bartenschlager (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**(12): 8873-8882.

Modis, Y., S. Ogata, D. Clements and S. C. Harrison (2004). "Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion." Nature **427**(6972): 313-319.

Morrison, J., S. Aguirre and A. Fernandez-Sesma (2012). "Innate immunity evasion by Dengue virus." Viruses **4**(3): 397-413.

Munoz-Jordan, J. L., M. Laurent-Rolle, J. Ashour, L. Martinez-Sobrido, M. Ashok, W. I. Lipkin and A. Garcia-Sastre (2005). "Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses." J Virol **79**(13): 8004-8013.

Munoz-Jordan, J. L., G. G. Sanchez-Burgos, M. Laurent-Rolle and A. Garcia-Sastre (2003). "Inhibition of interferon signaling by dengue virus." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14333-14338.

Murray, N. E., M. B. Quam and A. Wilder-Smith (2013). "Epidemiology of dengue: past, present and future prospects." Clin Epidemiol **5**: 299-309.

Nemesio, H. and J. Villalain (2014). "Membrane interacting regions of Dengue virus NS2A protein." J Phys Chem B **118**(34): 10142-10155.

Perera, R. and R. J. Kuhn (2008). "Structural proteomics of dengue virus." Curr Opin Microbiol **11**(4): 369-377.

Plaszczyc, A., P. Scaturro, C. J. Neufeldt, M. Cortese, B. Cerikan, S. Ferla, A. Brancale, A. Pichlmair and R. Bartenschlager (2019). "A novel interaction between dengue virus nonstructural protein 1 and the NS4A-2K-4B precursor is required for viral RNA replication but not for formation of the membranous replication organelle." PLoS Pathog **15**(5): e1007736.

Quintavalle, M., S. Sambucini, V. Summa, L. Orsatti, F. Talamo, R. De Francesco and P. Neddermann (2007). "Hepatitis C virus NS5A is a direct substrate of casein kinase I-alpha, a cellular kinase identified by inhibitor affinity chromatography using specific NS5A hyperphosphorylation inhibitors." J Biol Chem **282**(8): 5536-5544.

Raghupathy, R., U. C. Chaturvedi, H. Al-Sayer, E. A. Elbishbishi, R. Agarwal, R. Nagar, S. Kapoor, A. Misra, A. Mathur, H. Nusrat, F. Azizieh, M. A. Khan and A. S. Mustafa (1998). "Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever." J Med Virol **56**(3): 280-285.

Rawlinson, S. M., M. J. Pryor, P. J. Wright and D. A. Jans (2009). "CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production." J Biol Chem **284**(23): 15589-15597.

Ray, D., A. Shah, M. Tilgner, Y. Guo, Y. Zhao, H. Dong, T. S. Deas, Y. Zhou, H. Li and P. Y. Shi (2006). "West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5." J Virol **80**(17): 8362-8370.

Rubbi, C. P. and J. Milner (2003). "Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses." EMBO J **22**(22): 6068-6077.

Sangiambut, S., P. Keelapang, J. Aaskov, C. Puttikhunt, W. Kasinrerak, P. Malasit and N. Sittisombut (2008). "Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection." J Gen Virol **89**(Pt 5): 1254-1264.

Scherl, A., Y. Coute, C. Deon, A. Calle, K. Kindbeiter, J. C. Sanchez, A. Greco, D. Hochstrasser and J. J. Diaz (2002). "Functional proteomic analysis of human nucleolus." Mol Biol Cell **13**(11): 4100-4109.

Scott, D. D. and M. Oeffinger (2016). "Nucleolin and nucleophosmin: nucleolar proteins with multiple functions in DNA repair." Biochem Cell Biol **94**(5): 419-432.

Shah, P. S., N. Link, G. M. Jang, P. P. Sharp, T. Zhu, D. L. Swaney, J. R. Johnson, J. Von Dollen, H. R. Ramage, L. Satkamp, B. Newton, R. Huttenhain, M. J. Petit, T. Baum, A. Everitt, O. Laufman, M. Tassetto, M. Shales, E. Stevenson, G. N. Iglesias, L. Shokat, S. Tripathi, V. Balasubramaniam, L. G. Webb, S. Aguirre, A. J. Willsey, A. Garcia-Sastre, K. S. Pollard, S. Cherry, A. V. Gamarnik, I. Marazzi, J. Taunton, A. Fernandez-Sesma, H. J. Bellen, R. Andino and N. J. Krogan (2018). "Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis." Cell **175**(7): 1931-1945 e1918.

Sharma, M., J. P. Kamil, M. Coughlin, N. I. Reim and D. M. Coen (2014). "Human cytomegalovirus UL50 and UL53 recruit viral protein kinase UL97, not protein kinase C, for disruption of nuclear lamina and nuclear egress in infected cells." J Virol **88**(1): 249-262.

Shrivastava, G., J. Garcia-Cordero, M. Leon-Juarez, G. Oza, J. Tapia-Ramirez, N. Villegas-Sepulveda and L. Cedillo-Barron (2017). "NS2A comprises a putative viroporin of Dengue virus 2." Virulence **8**(7): 1450-1456.

Swarbrick, C. M. D., C. Basavannacharya, K. W. K. Chan, S. A. Chan, D. Singh, N. Wei, W. W. Phoo, D. Luo, J. Lescar and S. G. Vasudevan (2017). "NS3 helicase from dengue virus specifically recognizes viral RNA sequence to ensure optimal replication." Nucleic Acids Res **45**(22): 12904-12920.

Tan, B. H., J. Fu, R. J. Sugrue, E. H. Yap, Y. C. Chan and Y. H. Tan (1996). "Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in Escherichia coli exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity." Virology **216**(2): 317-325.

Tay, M. Y., J. E. Fraser, W. K. Chan, N. J. Moreland, A. P. Rathore, C. Wang, S. G. Vasudevan and D. A. Jans (2013). "Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1-4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin." Antiviral Res **99**(3): 301-306.

Tay, M. Y., K. Smith, I. H. Ng, K. W. Chan, Y. Zhao, E. E. Ooi, J. Lescar, D. Luo, D. A. Jans, J. K. Forwood and S. G. Vasudevan (2016). "The C-terminal 18 Amino Acid Region of Dengue Virus NS5 Regulates its Subcellular Localization and Contains a Conserved Arginine Residue Essential for Infectious Virus Production." PLoS Pathog **12**(9): e1005886.

Tesh, R. B. (1979). "A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures." Am J Trop Med Hyg **28**(6): 1053-1059.

Thomas, S., J. Rai, L. John, S. Schaefer, B. M. Putzer and O. Herchenroder (2013). "Chikungunya virus capsid protein contains nuclear import and export signals." Virology **10**: 269.

Tsuda, Y., Y. Mori, T. Abe, T. Yamashita, T. Okamoto, T. Ichimura, K. Moriishi and Y. Matsuura (2006). "Nucleolar protein B23 interacts with Japanese encephalitis virus core protein and participates in viral replication." Microbiol Immunol **50**(3): 225-234.

Uchil, P. D., A. V. Kumar and V. Satchidanandam (2006). "Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells." J Virol **80**(11): 5451-5464.

Waggoner, S. and P. Sarnow (1998). "Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocalization of nucleolin in poliovirus-infected cells." J Virol **72**(8): 6699-6709.

Walker, E. J., P. Younessi, A. J. Fulcher, R. McCuaig, B. J. Thomas, P. G. Bardin, D. A. Jans and R. Ghildyal (2013). "Rhinovirus 3C protease facilitates specific nucleoporin cleavage and mislocalisation of nuclear proteins in infected host cells." PLoS One **8**(8): e71316.

Webb, B. and A. Sali (2017). "Protein Structure Modeling with MODELLER." Methods Mol Biol **1654**: 39-54.

Westaway, E. G., A. A. Khromykh, M. T. Kenney, J. M. Mackenzie and M. K. Jones (1997). "Proteins C and NS4B of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus." Virology **234**(1): 31-41.

Westaway, E. G., J. M. Mackenzie and A. A. Khromykh (2002). "Replication and gene function in Kunjin virus." Curr Top Microbiol Immunol **267**: 323-351.

Wu, S., S. Pan, L. Zhang, J. Baines, R. Roller, J. Ames, M. Yang, J. Wang, D. Chen, Y. Liu, C. Zhang, Y. Cao and B. He (2016). "Herpes Simplex Virus 1 Induces Phosphorylation and Reorganization of Lamin A/C through the gamma134.5 Protein That Facilitates Nuclear Egress." J Virol **90**(22): 10414-10422.

Yang, J., R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson and Y. Zhang (2015). "The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction." Nat Methods **12**(1): 7-8.

Yang, M. R., S. R. Lee, W. Oh, E. W. Lee, J. Y. Yeh, J. J. Nah, Y. S. Joo, J. Shin, H. W. Lee, S. Pyo and J. Song (2008). "West Nile virus capsid protein induces p53-mediated apoptosis via the sequestration of HDM2 to the nucleolus." Cell Microbiol **10**(1): 165-176.

Yap, T. L., T. Xu, Y. L. Chen, H. Malet, M. P. Eglhoff, B. Canard, S. G. Vasudevan and J. Lescar (2007). "Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution." J Virol **81**(9): 4753-4765.

Yocupicio-Monroy, M., R. Padmanabhan, F. Medina and R. M. del Angel (2007). "Mosquito La protein binds to the 3' untranslated region of the positive and negative polarity dengue virus RNAs and relocates to the cytoplasm of infected cells." Virology **357**(1): 29-40.

Yon, C., T. Teramoto, N. Mueller, J. Phelan, V. K. Ganesh, K. H. Murthy and R. Padmanabhan (2005). "Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase." J Biol Chem **280**(29): 27412-27419.

Yu, I. M., W. Zhang, H. A. Holdaway, L. Li, V. A. Kostyuchenko, P. R. Chipman, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann and J. Chen (2008). "Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation." Science **319**(5871): 1834-1837.

Zhao, Y., T. S. Soh, J. Zheng, K. W. Chan, W. W. Phoo, C. C. Lee, M. Y. Tay, K. Swaminathan, T. C. Cornvik, S. P. Lim, P. Y. Shi, J. Lescar, S. G. Vasudevan and D. Luo (2015). "A crystal structure of the Dengue virus NS5 protein reveals a novel inter-domain interface essential for protein flexibility and virus replication." PLoS Pathog **11**(3): e1004682.

Zhou, Y., D. Ray, Y. Zhao, H. Dong, S. Ren, Z. Li, Y. Guo, K. A. Bernard, P. Y. Shi and H. Li (2007). "Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase." J Virol **81**(8): 3891-3903.