



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTOMICA Y PATOGENESIS
MOLECULAR

“Evaluación del tráfico núcleo-citoplasma durante la
infección con el virus Zika”

T E S I S

QUE PRESENTA:

DE JESÚS GONZÁLEZ LUIS ADRIÁN

:

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA
Y
PATOGENESIS MOLECULAR

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. ROSA MARÍA DEL ANGEL NÚÑEZ DE CÁCERES

DRA. ANA LORENA GUTIÉRREZ ESCOLANO

CIUDAD DE MÉXICO

JULIO, 2022

CRÉDITOS A LAS INSTITUCIONES

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca brindada para realizar este proyecto, el cual se desarrolló en el departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), bajo la cotutoría de la Dra. Rosa María del Ángel y la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano. Este trabajo fue asesorado por la Dra. Patricia Talamás Rohana, la Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez y el Dr. Bulmaro Cisneros Vega profesores e investigadores del CINVESTAV unidad Zacatenco y la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, plantel Del Valle.

COTUTORAS:

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

ASESORES:

Dra. Patricia Talamás Rohana

Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

NUMERO DE CVU

780737

Agradecimientos

A mi mamá y a mi papá, que fueron el principal apoyo para la realización de este trabajo, los amo.

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

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

A mis amigos y compañeros de laboratorio (vatillos team) Fidel Osuna Ramos, José Manuel Reyes Ruiz, Selvin Noé Palacios Rápalo, Carlos Daniel Cordero Rivero, Farfán Morales Noé, Fernando Medina y Jaime Zarco, por su amistad, sus enseñanzas y sus consejos dentro y fuera del laboratorio.

Gracias a mis asesores, a la Dra. Patricia Talamás Rohana, Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez y el Dr. Bulmaro Cisneros Vega, por su tiempo y sus consejos, los admiro mucho.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción	3
Epidemiología.....	3
Sintomatología.....	4
Diagnóstico.....	5
Tratamiento	5
Biología del virus.....	6
Genoma de ZIKV	6
Proteínas virales.....	6
Ciclo replicativo de ZIKV.....	8
Antecedentes.....	9
El NPC como objetivo de las proteasas virales: el control del transporte núcleo-citoplasmático	9
Estructura y función de los NPC en la célula: una forma de acceder al núcleo	11
La maquinaria del Complejo de Poro Nuclear (NPC)	11
Transporte bidireccional Núcleo-Citoplasma.....	12
Participación del NPC en la infección con <i>Flavivirus</i>	15
La proteína no estructural 3 (NS3): una “Shuttling Protein”	16
Alteraciones del NPC por ZIKV: la escisión del complejo.....	17
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares	20
Estrategia experimental	21
Materiales y Métodos.....	22
Cultivo e infección de células Huh7 con ZIKV	22
Plásmido pcDNAplus NS2B3ZIKV.....	22
Propagación del plásmido con el inserto de NS2B3 y NS2B3-S135A de ZIKV.	23
Mutación de la NLS-putativa de la proteína NS3.....	24

Transfección de células Huh7 con el plásmido que codifica a NS2B-NS3 o a la NLS del SV40-tetraGFP.....	25
Preparación de extractos de proteínas totales	25
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	26
Transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	26
Western Blot	26
Inmunofluorescencia.....	27
Ensayo de hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH) para detección de mRNAs	28
Ensayos de microscopía inmunoelectrónica de transmisión (TIM)	28
Predicción <i>in silico</i> de NLS o NES de la proteína NS3 de ZIKV y otros Flavivirus	29
Modelado 3D de la proteína NS3 de ZIKV y acoplamiento molecular de NS3-Importin α	30
Viabilidad celular a IVM y LMB	30
Inhibición de la importación nuclear clásica (Importin alfa/beta) con IVM e inhibición de la exportación nuclear (CRM-1) con LMB	31
Análisis de imágenes y análisis estadístico	31
Resultados	33
La infección por ZIKV induce cambios en la envoltura nuclear	33
La infección por ZIKV altera la composición del NPC.....	34
La proteasa NS2B-NS3 de ZIKV altera la integridad de la NPC al alterar las nucleoporinas Nup98, Nup153 y TPR	36
La infección con ZIKV altera la localización subcelular de proteínas reporteras que contienen secuencias de transporte núcleo-citoplasma. ...	38
La proteasa NS2B-NS3 de ZIKV altera el exporte de mRNAs	47
NS3 de ZIKV se localiza en el núcleo celular al inicio de la infección, y en el citoplasma en tiempos posteriores de la infección de las células Huh-7. ...	49
Ivermectina y leptomicina B inhiben el importe y exporte nuclear de la proteína NS3 de ZIKV en células Huh-7	53
Predicción <i>in silico</i> de señales de localización nuclear (NLS) y señales de exporte nuclear (NES) en la proteína NS3 de ZIKV.....	60
Una mutación en la NLS-210 putativa de la proteína NS3 de ZIKV impide su localización nuclear.	64
Discusión	68

Conclusiones	76
Perspectivas	77
Bibliografía.....	78

Resumen

Diferentes virus de RNA de cadena positiva modifican el tráfico núcleo-citoplasma, procesando componentes del complejo de poro nuclear (NPC) a través de varios mecanismos. Estas alteraciones se llevan a cabo para (a) acceder a proteínas nucleares que participan en la replicación viral en el citoplasma, (b) modular la respuesta inmune antiviral al prevenir el tráfico de factores de transcripción al núcleo y (c) regular negativamente la exportación de ARNm al citoplasma evitando la competencia por la maquinaria de traducción y reduciendo la traducción de proteínas relacionadas con la respuesta antiviral.

Durante este estudio encontramos que la proteína viral NS3 (proteasa/helicasa) del virus ZIKA (ZIKV) procesa a las nucleoporinas TPR, Nup153 y Nup98, componentes del NPC. Además, analizamos el estado de diferentes vías de transporte núcleo-citoplasma, encontrando alteraciones en la vía de importina α/β , transportina 1, vía KNS y el exporte nuclear vía CRM-1. También determinamos que los mRNAs son retenidos en el núcleo durante la infección con ZIKV y la transfección de la proteína NS3. Debido a la alteración de componentes nucleares por parte de la proteína NS3, analizamos si puede localizarse en núcleo durante la infección. Encontramos que la proteína NS3 se encuentra en este compartimento a tiempos tempranos de la infección y en el citoplasma a tiempos tardíos. La proteína NS3 se importa al núcleo mediante la vía importina α/β y se exporta al citoplasma vía CRM-1.

Nuestros resultados indican que los cambios en el transporte núcleo-citoplasma inducidos por la proteína NS3 genera un estado que favorece la replicación viral.

Abstract

Different positive-stranded RNA viruses modify nuclear-cytoplasmic trafficking, processing the nuclear pore complex (NPC) components through various mechanisms. These alterations are carried out to (a) access nuclear proteins that participate in viral replication in the cytoplasm, (b) modulate the antiviral immune response by preventing trafficking of transcription factors to the nucleus, and (c) negatively regulate viral export of cells mRNA to the cytoplasm avoiding competition for the translation machinery and reducing the translation of proteins related to the antiviral response.

During this study, we found that the viral protein NS3 (protease/helicase) of ZIKV processes TPR, Nup153, and Nup98, components of the NPC. In addition, we analyzed the status of different nucleo-cytoplasmic transport pathways, finding alterations in the importin α/β pathway, transportin 1, the KNS pathway, and nuclear export via CRM-1. We also found that mRNAs are retained in the nucleus during ZIKV infection and NS3 transfection. Due to the role of NS3 in altering nuclear components, we analyzed whether NS3 can be localized to the nucleus during ZIKV infection. Our results indicate that NS3 is imported into the nucleus via the importin α/β pathway and is exported via CRM-1 to the cytoplasm.

In summary, NS3 induces changes nucleo-cytoplasmic transport generating a state that favors viral replication.

Introducción

Epidemiología

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

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

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

reportaron casos de infección (Díaz-Quíñonez et al., 2016). La Secretaría de Salud de México reportó que en el periodo de 2015-2022 hubo 12 993 casos de ZIKV autóctono, de los cuales 7 152 fueron infecciones en mujeres embarazadas (Salud, 2022).

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

Sintomatología

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

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

Esta observación, se suma a lo reportado en el brote de ZIKV en la Polinesia Francesa, en donde hubo 95 casos de microcefalia en los neonatos de mujeres contagiadas de ZIKV en el primer trimestre de embarazo (Miner & Diamond, 2017).

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

Diagnóstico

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

Tratamiento

Actualmente no se cuenta con un tratamiento específico para la infección de ZIKV. Para los pacientes se recomienda reposo, antipiréticos (recomendado para reducir la fiebre), antihistamínicos (recomendados para los salpullidos

cutáneos) y analgésicos (para reducir el dolor) (Musso & Gubler, 2016; Shuaib et al., 2016).

Biología del virus

Genoma de ZIKV

El virus Zika, pertenece a la familia *Flaviviridae*. Este virus posee un genoma de RNA de cadena sencilla de sentido positivo, que comprende unos 10 794 b, que codifican a una poliproteína con una longitud de 3419 - 3423 aa, dependiendo de la cepa (Barzon et al., 2016; Plourde & Bloch, 2016). Esta poliproteína es traducida como un solo marco de lectura abierto y es procesada por proteasas celulares y virales para generar las proteínas maduras del virus (Medin & Rothman, 2017). En el extremo 5' y 3' del marco de lectura abierto (ORF, del inglés *open reading frame*), se encuentran dos regiones no codificantes (UTR); además, en el extremo 5' posee un CAP y a diferencia de los RNAm celulares en el extremo 3' carece de una cola de poliA. En su lugar, contiene un CU_{OH}. Ambas regiones UTR participan en la regulación de la traducción y replicación del genoma viral (Saiz et al., 2016; Tilgner & Shi, 2004).

Proteínas virales

La poliproteína una vez procesada proteolíticamente, da origen a 3 proteínas estructurales (C, E y prM), necesarias para la formación de viriones infecciosos y a 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5), necesarias para la replicación del RNA viral (**Figura 1**). El procesamiento de la poliproteína, está dado por proteínas celulares y la proteína NS3 la cual en

su extremo N-terminal tiene un dominio serina proteasa, que requiere de su cofactor NS2B para su actividad (Rather et al., 2017; Song et al., 2017).

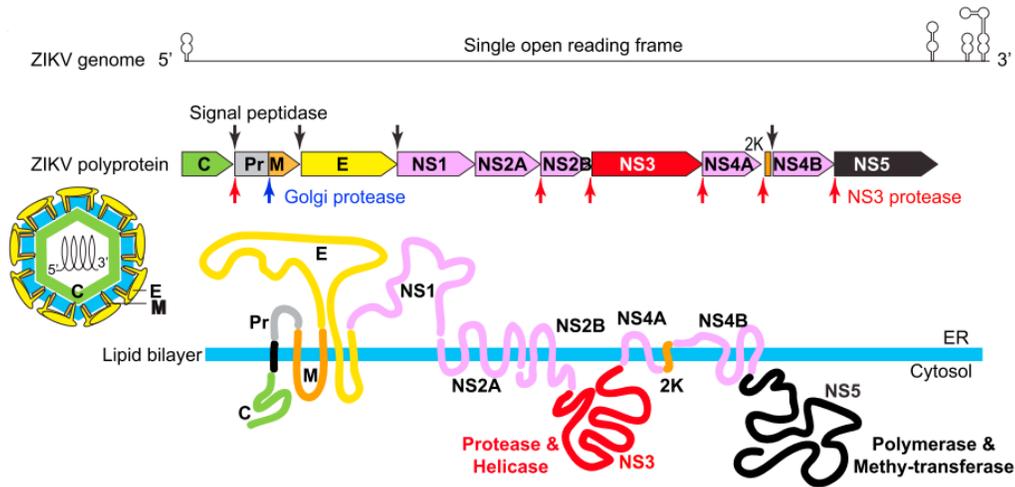


Figura 1: Representación esquemática del genoma de ZIKV y estructura de la poliproteína. Tomado de (Ming et al., 2016).

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

La proteína no estructural NS1 (46-55 kDa) es una glicoproteína que participa en la replicación viral, patogénesis y en la evasión del sistema inmune de la célula. La NS2A (25 kDa) participa en el ensamble del virión y es un antagonista en las vías de respuesta de IFN. La proteína NS2B (14 kDa) es un cofactor para la función serina proteasa de la proteína NS3; el dominio hidrofílico central le proporciona orientación, mientras que los dominios terminales hidrofóbicos participan en el anclaje del complejo NS2B-NS3 a la

membrana del retículo endoplásmico (RE). La proteína NS3 (69 kDa) tiene un dominio N-terminal con función de serina proteasa, que se encarga de procesar a la poliproteína viral, mediante la unión de NS2B. El dominio C-terminal tiene función de helicasa, que participa en el desenrollamiento del RNA durante la replicación. La NS4A (16 kDa) regula la actividad ATPasa de la helicasa de la proteína NS3. El péptido 2k es una señal para el procesamiento de la proteína NS4B. Por su parte, la proteína NS4B inhibe la fosforilación de STAT1 que conduce al bloqueo de la vía del IFN α y β . La proteína NS5 (103 kDa) es la más grande y conservada del virus, en su dominio N-terminal tiene función metil-transferasa y en su dominio C-terminal tiene función RNA polimerasa dependiente de RNA (Armstrong et al., 2017; Barzon et al., 2016; Saiz et al., 2016; Song et al., 2017).

Ciclo replicativo de ZIKV

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

La poliproteína es procesada por el complejo NS2B-NS3 y por las proteasas celulares para generar las proteínas virales maduras. El genoma viral de sentido positivo se copia para dar lugar a un RNA de sentido (-), que servirá de molde para la síntesis múltiples copias de RNA (+) que formarán los genomas de la progenie viral (reacción catalizada por proteínas NS como la polimerasa dependiente de RNA NS5). El genoma viral es empaquetado por

la proteína C y adquiere la envoltura durante la salida del RE. Los viriones inmaduros son transportados por la vía del trans-Golgi, donde ocurre la glicosilación y escisión de la proteína prM por la proteasa celular furina, generando viriones maduros que son liberados por exocitosis (Barzon et al., 2016; Medin & Rothman, 2017; Mukhopadhyay et al., 2005a; Saiz et al., 2016).

Antecedentes

El NPC como objetivo de las proteasas virales: el control del transporte núcleo-citoplasmático

La mayoría de los virus con replicación nuclear y citoplasmática requieren proteínas nucleares para facilitar su replicación (Cohen et al., 2011). En los virus con replicación citoplasmática, algunas proteínas virales se localizan en los núcleos durante la infección. Además, se ha demostrado que la inhibición del transporte nuclear de proteínas virales utilizando diferentes fármacos dirigidos hacia la maquinaria de transporte inhibe la replicación viral, lo que sugiere que las proteínas virales tienen un papel esencial en el núcleo de las células infectadas (Lopez-Denman & Mackenzie, 2017a).

Diferentes virus de ARN de cadena positiva modifican el tráfico núcleo-citoplasma, alterando el Complejo de Poros Nucleares (NPC) a través de diferentes mecanismos (**Tabla 1**). Estas alteraciones se llevan a cabo con el fin de a) acceder a proteínas nucleares que participan en la replicación viral en el citoplasma, b) modular la respuesta inmune antiviral impidiendo el tráfico de factores de transcripción al núcleo, y c) impedir la exportación del RNAm celular al citoplasma evitando la competencia por la maquinaria de traducción y reduciendo la traducción de proteínas relacionadas con la respuesta antiviral (Castelló et al., 2009a; Gustin & Sarnow, 2001a, 2002a; Lopez-Denman & Mackenzie, 2017b; Park et al., 2008a; Watters & Palmenberg, 2011a).

Dado que se ha descrito que el importe-exporte de proteínas virales y celulares a través del NPC juegan un papel esencial en la replicación de algunos virus, el transporte nuclear-citoplasmático puede ser alterado a través de la degradación de nucleoporinas (Nups), componentes del NPC por proteasas virales (De Jesús-González et al., 2021).

Tabla 2. Mecanismos que los virus de RNA de cadena positiva utilizan para afectar el tráfico núcleo-citoplasma.

Grupo Baltimore	ARN-virus (Familia)	Viral proteína	Mecanismo de alteración de NPC
IV (ssRNA +)	SARS-CoV (<i>Coronaviridae</i>)	NSP1	Deslocalización de Nup93 a nucleoplasma (Gomez et al., 2019).
	SARS-CoV-2 (<i>Coronaviridae</i>)	ORF6	Deslocalización de RAE-1 y Nup98 al citoplasma y acumulación nuclear de hnRNP A1 (Kato et al., 2021)
	SARS-CoV-2 (<i>Coronaviridae</i>)	ORF6	Secuestro del complejo RAE-1-Nup98 para evitar la translocación nuclear de STAT-1 y 2 y así prevenir la respuesta ifn [11].
	DENV (<i>Flaviviridae</i>)	NS3pro	Escisión de Nup153, Nup98 y Nup62 por proteasa viral (De Jesús-González et al., 2020).
	ZIKV (<i>Flaviviridae</i>)	NS3pro	Escisión de TPR, Nup153 y Nup98 por proteasa viral (De Jesús-González et al., 2020).
	Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (<i>Arteriviridae</i>)	Nsp1β	Alteración de la respuesta inmune, a través de la interacción con Nup62 que interrumpe la importación de factores de transcripción relacionados con IFN (Ke et al., 2019).
	Virus de la encefalomiocarditis (<i>Picornaviridae</i>)	Líder	Inhibición del tráfico núcleo-citoplasmático por hiperfosforilación de Nup62, Nup153 y Nup214 (Porter & Palmenberg, 2009).
	Virus de la encefalomielitis murina de Theiler (<i>Picornaviridae</i>)	Líder	Bloquea la exportación de ARNm celular y promueve la fosforilación de Nup98 (Ricour et al., 2009).
	Rinovirus (<i>Picornaviridae</i>)	2A profesional	La escisión de Nup62, Nup98, Nup153, Nup98 por proteasa viral altera el transporte núcleo-citoplasma (Castelló et al., 2009b; Gustin & Sarnow, 2002b; Park et al., 2010; Watters et al., 2017; Watters & Palmenberg, 2011b).
	Rinovirus (<i>Picornaviridae</i>)	3C pro/3CD	La escisión de Nup358 (TPR), Nup214, Nup153 y Nup62 por proteasa viral altera el transporte de núcleo-citoplasma (Ghildyal et al., 2009; Walker et al., 2013).
Poliovirus (<i>Picornaviridae</i>)	2A profesional	La escisión de Nup153, Nup98, Nup62 por proteasa viral altera el transporte núcleo-citoplasma (Gustin & Sarnow, 2001b; Park et al., 2008b).	

V (ssRNA -)	Virus de la fiebre del Valle del Rift (<i>Phenuiviridae</i>)	Proteína no estructural	Alteración de la respuesta antiviral por la degradación de Nup62. Además, Nup98 participa en la importación de NSs al núcleo y replicación viral (Lau & Weber, 2020).
	Virus de la influenza A (<i>Orthomyxoviridae</i>)	NS2	Interacción con Nup214 para exportación de vRNA (ŞENBAŞ AKYAZI et al., 2020).
	Virus de la influenza A (<i>Orthomyxoviridae</i>)	NS2	La interacción con Nup98 promueve la propagación viral (Chen et al., 2010).
	Virus de la influenza A (<i>Orthomyxoviridae</i>)	-	Regulación de la respuesta inmune antiviral mediante la disminución de Nup98 y Rae1. También está relacionado con un deterioro selectivo de la exportación de ARNm (Satterly et al., 2007).
VI (ssRNA-RT)	VIH-1 (<i>Retroviridae</i>)	-	La regulación negativa de Nup62 promueve la reubicación de hnRNP A1 y vRNA al citoplasma (Monette et al., 2009). RanBP2 / Nup358, Nup153 y Nup98 participan en el anclaje de la cápside al núcleo (Buffone et al., 2018; Di Nunzio et al., 2012a, 2012b, 2013; Gallay et al., 1997; Haffar et al., 2000; Hamid et al., 2015; Jenkins et al., 1998; König et al., 2008; Ocwieja et al., 2011).
	VIH-1 (<i>Retroviridae</i>)	Matrix, Vpr e Integrase	

Estructura y función de los NPC en la célula: una forma de acceder al núcleo

La maquinaria del Complejo de Poro Nuclear (NPC)

El importe y exporte de proteínas virales requiere de la interacción con los componentes de la envoltura nuclear (Ne) que está formada por una doble membrana que alberga canales proteicos llamados complejos de poros nucleares (NPCs) formados por múltiples copias de nucleoporinas (Nups), que participan en el transporte bidireccional núcleo-citoplasma de macromoléculas, subunidades ribosómicas, proteínas virales y ARN (ARNm, rRNAs, tRNAs, miRNAs) tanto de origen celular como viral (Beck & Hurt, 2017; Hezwani & Fahrenkrog, 2017; Maimon et al., 2012).

El NPC se compone de aproximadamente 30 múltiples copias de Nups, dispuestas desde el citoplasma hasta el nucleoplasma, que forman los filamentos citoplasmáticos, el anillo citoplasmático, el anillo de poro interno, el

anillo nuclear y la canasta nuclear (Jahed et al., 2016; Schwartz, 2016). Dentro del NPC hay Nups con secuencias repetidas ricas en fenilalanina (Phe) y glicina (Gly), llamadas FG-Nups, como Nup358, Nup62, Nup58, Nup54, Nup98, Nup45, Nup214, hCG1, Nup153, TPR y Nup50, que facilitan el transporte nuclear en ambas direcciones ya que se unen a los receptores de transporte nuclear (NTR.) (**Figura 2**) (C. Li et al., 2016; Rothballer & Kutay, 2012; Wentz & Rout, 2010).

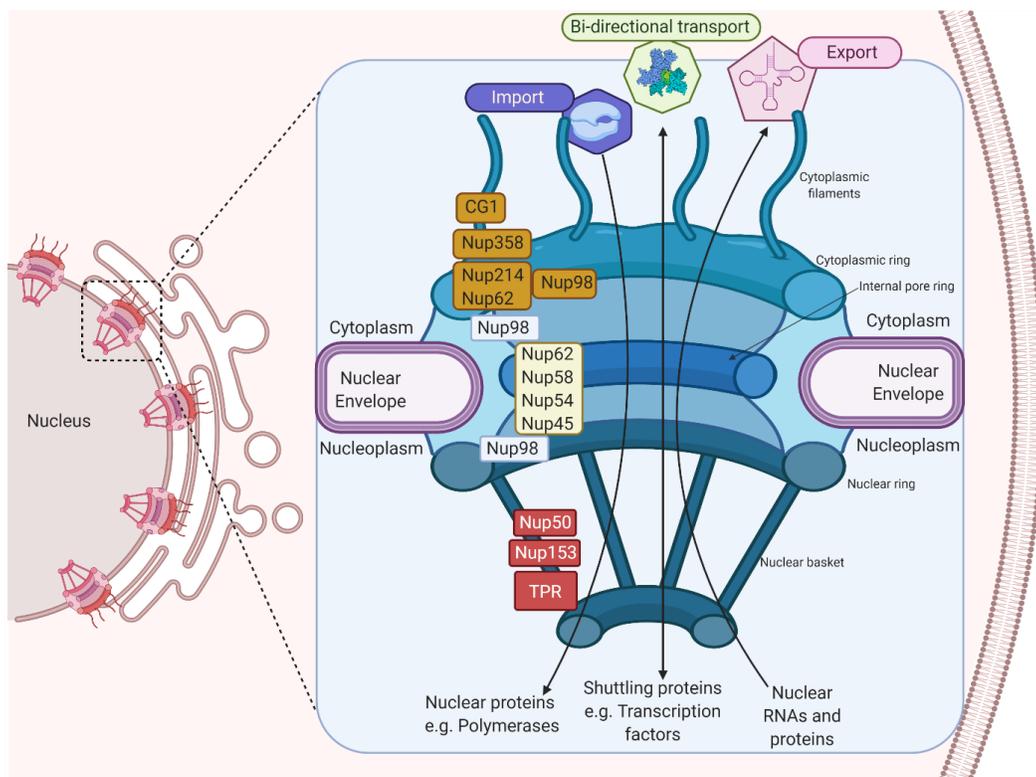


Figura 2. La maquinaria del Complejo de Poros Nucleares. El NPC participa en la importación y exportación nuclear de proteínas y RNA. La figura muestra los FG-Nups, que participan en el transporte de núcleo-citoplasma (De Jesús-González et al., 2021).

Transporte bidireccional Núcleo-Citoplasma

Las moléculas pequeñas con peso molecular menos a 40-50 kDa pueden atravesar libremente de forma pasiva por la envoltura nuclear. Sin embargo, las moléculas de mayor peso molecular, y los RNAm de origen celular y viral,

se transportan activamente a través del NPC. El transporte (importe y exporte) está regulado por NTR (receptores de transporte nuclear), como importinas, exportinas, transportinas, carioferinas y pequeñas GTPasas de la familia Ran que regulan la actividad de las importinas y la exportinas que transportan moléculas cargo (**Figura 3**) (Jovanovic-Talisman & Zilman, 2017; Kabachinski & Schwartz, 2015; Wentz & Rout, 2010).

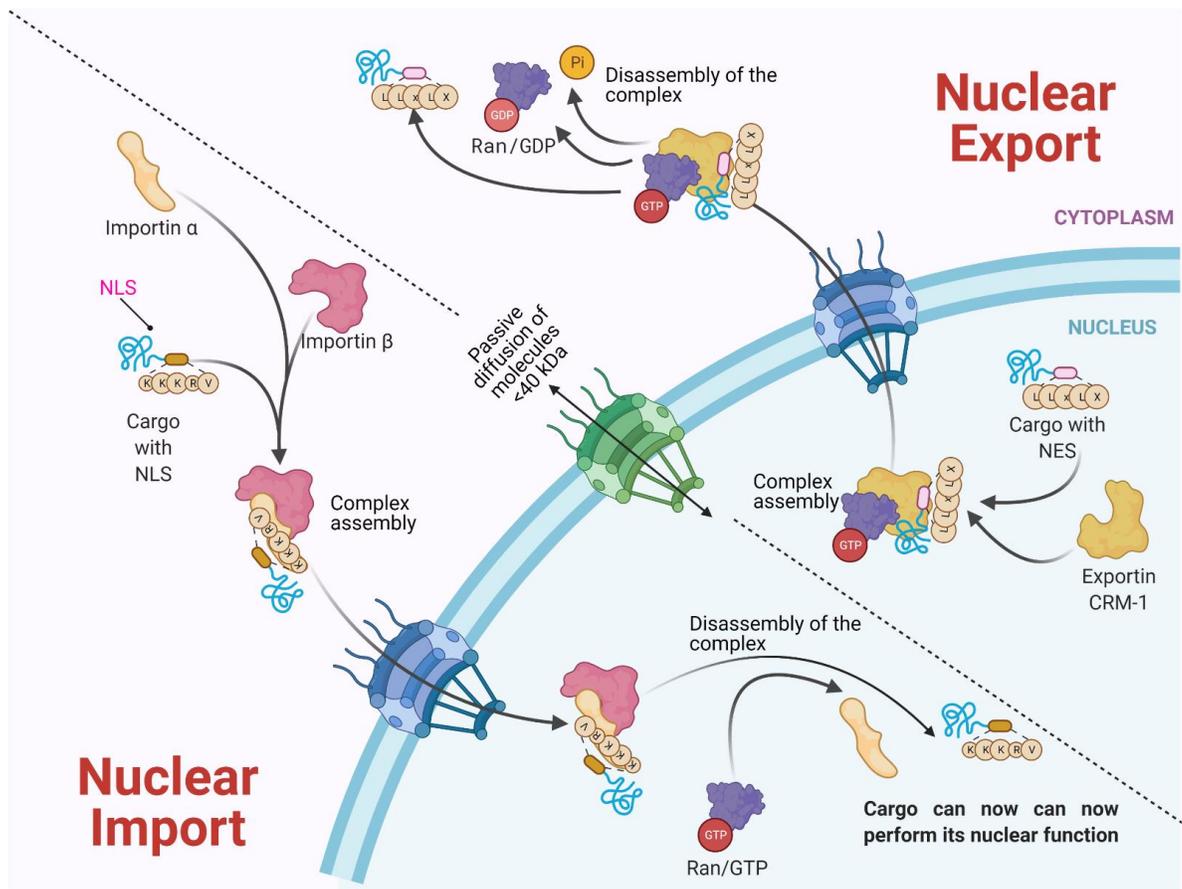


Figura 3. Transporte Bidireccional Núcleo-Citoplasma. En la vía clásica de importe (importina α/β), se forma el complejo importina α/β y proteína cargo, que contiene una secuencia de localización nuclear (NLS). En el caso del exporte a través de CRM-1, la proteína cargo incluye una secuencia de exportación nuclear (NES). Para ambos casos, se requiere un gradiente de GTP. Las moléculas <40 kDa pasan a través de difusión pasiva hacia el núcleo por el NPC

Los NTR reconocen secuencias específicas en proteínas cargo que atraviesan la membrana nuclear desde el citoplasma, como las secuencias de localización nuclear (NLS) que contienen aminoácidos repetidos de arginina (Arg o R) y lisina (Lys o K). La NLS clásica consiste en cinco aminoácidos KKKRK. Además, algunas proteínas poseen NLS bipartitas que consisten en dos grupos de aminoácidos básicos, separados por aproximadamente diez aminoácidos (Christie et al., 2016; Kosugi, Hasebe, Matsumura, et al., 2009).

Por otro lado, las secuencias de exportación nuclear (NES) participan en el tráfico de moléculas desde el núcleo hasta el citoplasma y están compuestas por secuencias ricas en leucina o aminoácidos hidrófobos como valina (Val), isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe) o metionina (Met), que se encuentran en motivos conservados en proteínas cargo, como algunos factores de transcripción o traducción y proteínas de transporte de RNAm (Hutten & Kehlenbach, 2007a; la Cour et al., 2003; Xu et al., 2010a).

La localización nuclear de una proteína se da mediante el reconocimiento de NLS por los NTR; por ejemplo, la importina α a través de su NTR se une al NLS-cargo, luego importina β se une a importina α para formar un complejo trimérico y su proteína cargo. Si la NLS es atípica, entonces importina β se une directamente a la proteína cargo sin la participación de importina α . La direccionalidad del cargo está dada por el gradiente RanGTP, que está regulado por el ciclo Ran-GTP/GDP (De Jesús-González et al., 2021).

Una vez que el complejo trimérico ha entrado al núcleo, el RanGTP activado por RCC1 (GEF) se une a importina β , liberándose de su proteína cargo. La importina β se transporta al citoplasma y el RanGTP se desactiva a RanGDP por GAP (GTPase Activating Protein), para liberarse de la importina β para su próximo ciclo de importe (De Jesús-González et al., 2021).

Por otro lado, la exportación nuclear está dada por el reconocimiento de las NES. La exportación nuclear inicia con la unión de Ran-GTP a exportina (por ejemplo, CRM-1), que causa un aumento de la afinidad por la proteína cargo. Luego, el complejo se mueve hacia el NPC y se hidroliza Ran-GTP (activado

por RCC1) y en el citoplasma, GAP desactiva a RanGTP (hidroliza el GTP en GDP), lo que hace que exportina se libere de su proteína cargo (Jovanovic-Talisman & Zilman, 2017; Kabachinski & Schwartz, 2015; Ogawa et al., 2012).

Participación del NPC en la infección con *Flavivirus*

Los *Flavivirus* son un género perteneciente a la familia *Flaviviridae*, que contienen virus como virus Spondweni (SPONV), virus de la fiebre amarilla (YFV), virus del Nilo Occidental (WNV), virus de la encefalitis japonesa (JEV), DENV y ZIKV, ampliamente distribuidos en áreas tropicales y subtropicales. (Collao et al., 2015; Lanciotti et al., 2016; Musso & Gubler, 2016; Saiz et al., 2016; Simmonds et al., 2017; Song et al., 2017). Estos virus son transmitidos por mosquitos del género *Aedes* spp., y causan enfermedades con alta morbilidad y mortalidad; por lo tanto, de importancia médica (Musso & Gubler, 2016).

Los *Flavivirus* tiene un ciclo replicativo citoplasmático, traduciendo y replicando su genoma en el RE (Brand et al., 2017a; Mackenzie, 2005; Mukhopadhyay et al., 2005b). Sin embargo, se ha observado que algunas proteínas virales como C, NS1, NS5 se localizan en el núcleo de las células Vero al contener NLS en su secuencia (Hertzog et al., 2018; Hou et al., 2017; Wang et al., 2017). Otras proteínas que se han localizado en el núcleo de las células infectadas son NS3 y NS4B (Cortese et al., 2017; Palacios-Rápalo et al., 2021; Reyes-Ruiz et al., 2018).

Por otro lado, la proteína NS3 es la única proteasa codificada por estos virus y es necesaria para el procesamiento de la poliproteína viral y la replicación del RNA, ya que tiene la función de proteasa y helicasa. Esta molécula también está implicada en el establecimiento de la infección. Por estas razones, se ha explorado como diana farmacológica frente a los diferentes flavivirus (Gruba et al., 2016; Y. Li, Phoo, et al., 2017; Y. Li, Zhang, et al., 2017).

La proteína no estructural 3 (NS3): una “Shuttling Protein”

La proteína NS3 de los flavivirus tiene un motivo de serina proteasa de tipo tripsin-like, además requiere un segmento hidrófilo de 40 residuos de la proteína transmembranal NS2B como cofactor y está implicada en el procesamiento de la poliproteína que genera las proteínas virales maduras (Luo et al., 2008; Mishra et al., 2018). La proteína NS3 tiene una tríada catalítica conservada en los diferentes miembros del género (His51, Asp75 y Ser135), y una longitud total de aproximadamente 620 aminoácidos. La proteasa NS3 corta entre los aminoácidos básicos Arg-Lys. Además de la función proteasa, en el extremo carboxilo tiene un motivo con actividad trifosfatasa, nucleósido trifosfatasa de ARN y de helicasa. La conservación de la secuencia de aminoácidos de la proteína NS3 entre los diferentes flavivirus (DENV, WNV, JEV, ZIKV e YFV) es de aproximadamente 50% a 75% (Behnam & Klein, 2020; Y. Li, Phoo, et al., 2017; Y. Li, Zhang, et al., 2017; Z. Li, Zhang, et al., 2017).

La localización subcelular de la proteína NS3 de ZIKV en la célula infectada es principalmente perinuclear y se ha encontrado asociada a lámina nuclear, un componente de la envoltura nuclear, formando sitios de extrusión. Por esta razón se sugiere que puede afectar la función del centrosoma (Hou et al., 2017). Además, la proteína NS3 se acumula en la cara cóncava de los núcleos alterados en forma de riñón y puede ser responsable de modificar otros componentes de la envoltura nuclear (Cortese et al., 2017). Nuestro grupo de investigación ha encontrado recientemente que la proteína NS3 de DENV se localiza en el núcleo de las células C6/36 (de origen mosquito) y Huh7 (de origen humano) infectadas con DENV en tiempos tempranos (8 a 12 horas después de la infección), y en tiempos tardíos (16 a 24 horas después de la infección) se encuentra en el citoplasma (Palacios-Rápalo et al., 2021; Reyes-Ruiz et al., 2018). Sin embargo, la localización nuclear de la proteína NS3 de

ZIKV no ha sido reportada, ni las secuencias (NLS y NES) y sistemas de transporte responsables de su localización nuclear.

Alteraciones del NPC por ZIKV: la escisión del complejo

En mi tesis de maestría describimos la alteración del NPC durante la infección de ZIKV. Encontramos que ZIKV reduce la cantidad de NUPs como TPR (ubicada en la canasta nuclear), Nup153 y Nup98 (Figura 4). Además, encontramos que la ubicación subcelular de algunas Nups también se vio afectada.

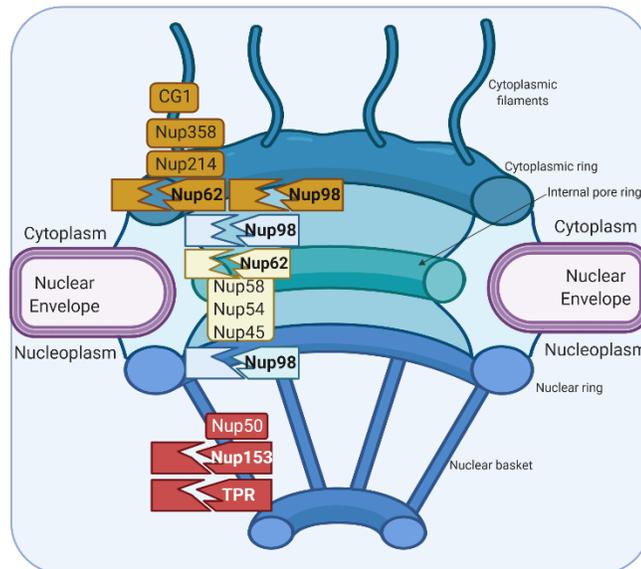


Figura 4. Alteración de nucleoporinas, componentes del NPC durante la infección con ZIKV.

El papel de la deslocalización, escisión/degradación del NPC durante la infección por ZIKV aún se desconoce (De Jesús-González et al., 2020). Sin embargo, en otros virus de RNA como son Poliovirus y Rinovirus, la degradación de la nucleoporinas por proteasas virales se ha asociado a la inhibición de la importe/exporte de factores de transcripción, RNAm y

modulación de la respuesta inmune para garantizar la replicación viral (Wubben et al., 2020).

La proteasa viral NS3 del ZIKV tiene la capacidad de procesar proteínas celulares, ya que se ha informado que puede procesar 31 proteínas celulares diferentes, como JIP4, ATG16L1, eIF4G1, TAK1. Entre ellas, el 42 % están involucradas en el procesamiento de la información genética, el 28 % en el transporte y el citoesqueleto, el 12 % en el metabolismo, el 10 % en la transducción de señales y el 8 % en la inmunidad (Hill et al., 2018). Por otro lado, NS3pro de ZIKV y DENV también escinden FAM134B (relacionado con la reticulofagia) (Dong et al., 2016); también NS3pro de ZIKV escinde Septin-2 (factor del citoesqueleto, relacionado con la citocinesis celular) (H. Li et al., 2019), PDIA3, ALDOA (glucólisis) (Tangsongcharoen et al., 2019), DDX21 (respuesta inmunitaria) (DENV) (Dong et al., 2016) y GrpEL1, (proteína de matriz mitocondrial) entre otras (Gandikota et al., 2020, p. 70).

Recientemente se ha reportado que la proteína NS3 de DENV puede procesar a las Nup153, Nup98 y Nup62 (De Jesús-González et al., 2020). Por lo que sería interesante analizar si la proteína NS3 de ZIKV también puede procesar componentes del NPC. Además, resulta de gran interés estudiar las consecuencias de la alteración del complejo del poro nuclear durante la infección con ZIKV y conocer la participación de estas alteraciones en la replicación viral. Este nuevo rol de NS3 en el ciclo replicativo viral hace a esta proteína un blanco muy interesante para el desarrollo de posibles fármacos.

Justificación

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

Una proteína indispensable para la replicación de ZIKV es la NS3 que tiene función de proteasa y helicasa. En nuestro laboratorio se ha descrito que durante la infección con ZIKV y DENV se altera el complejo del poro nuclear. En la literatura se describe que la alteración del NPC puede deberse a la acción de proteasas virales como en el caso de la infección con Poliovirus y Rinovirus y que estas afectan el tráfico núcleo-citoplasma de proteínas y mRNAs. Recientemente se ha reportado que la proteína NS3 de DENV puede procesar a las Nup153, Nup98 y Nup62 (De Jesús-González et al., 2020). Por lo que sería interesante analizar si la proteína NS3 de ZIKV también puede procesar nucleoporinas, y si esta alteración afecta el tráfico núcleo-citoplasma y como dicho efecto favorece la replicación viral.

Hipótesis

La alteración del complejo del poro nuclear por la proteasa NS3 de ZIKV afecta el tráfico núcleo-citoplasma de proteínas y mRNAs

Objetivo general

Evaluar el tráfico núcleo-citoplasma de proteínas y los mRNAs durante la alteración del complejo del poro nuclear por la proteasa NS3 de ZIKV

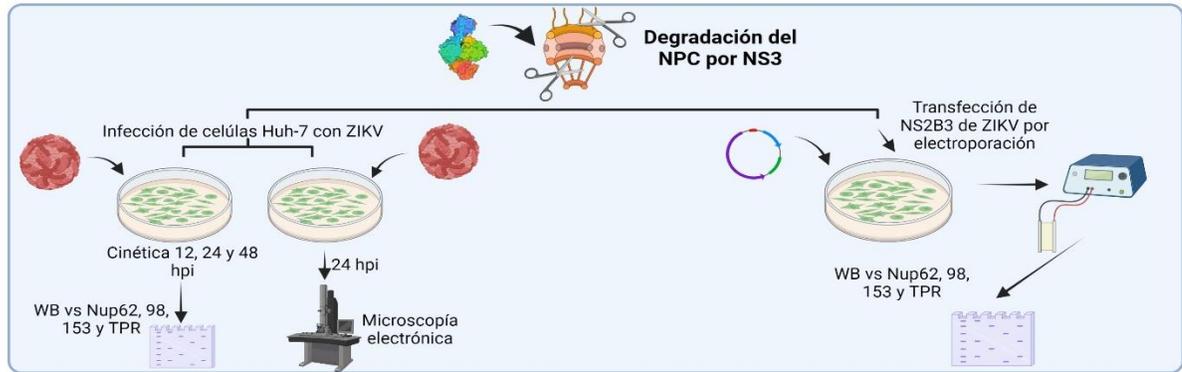
Objetivos particulares

- ✓ Evaluar la cinética de degradación de nucleoporinas durante la infección con ZIKV
- ✓ Evaluar los sistemas de importe y exporte de proteínas, así como el exporte de mRNAs durante la alteración del NPC por la infección con ZIKV
- ✓ Identificar las secuencias responsables de la localización/exporte nuclear de NS3 de ZIKV

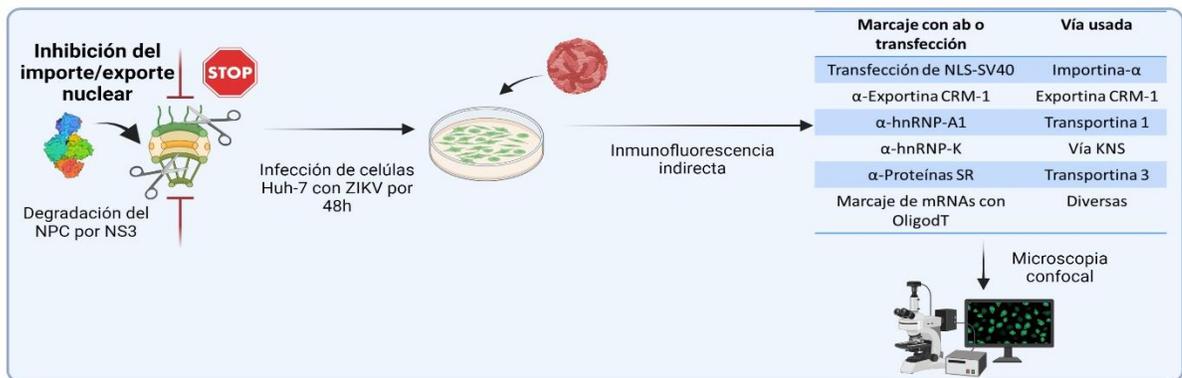
Estrategia experimental

Evaluación del tráfico núcleo-citoplasma durante la infección con el virus ZIKA

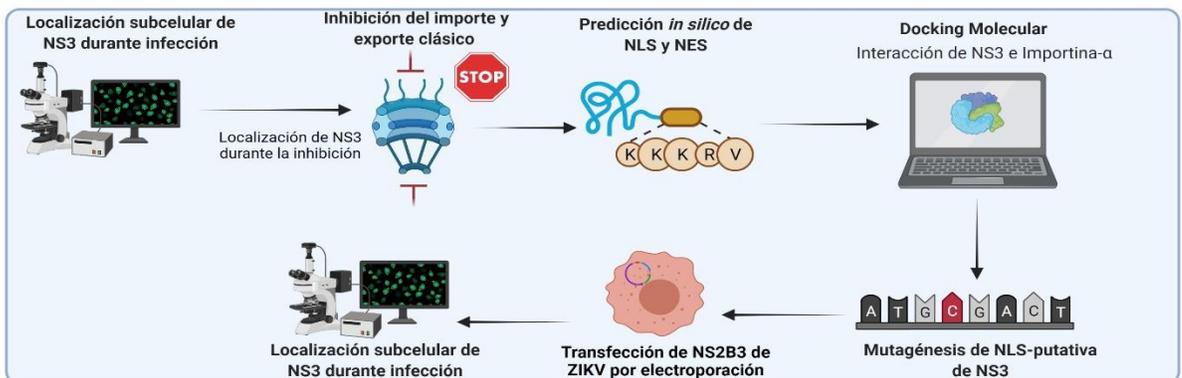
Objetivo 1: Evaluar la cinética de degradación de nucleoporinas por la proteasa NS2B3 durante la infección con ZIKV



Objetivo 2: Evaluar los sistemas de importe y exporte de proteínas, así como el exporte de mRNAs durante la alteración del NPC por la infección con ZIKV



Objetivo 3: Identificar las secuencias responsables de la localización/exporte nuclear de NS3 de ZIKV



Materiales y Métodos

Cultivo e infección de células Huh7 con ZIKV

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

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

Plásmido pcDNAplus NS2B3ZIKV

El plásmido pcDNAplus que contiene el inserto de NS2B3 (proteasa activa) y NS2B3-S135 (proteasa inactiva) de ZIKV (**Figura 5**), fue construido en el laboratorio del Dr. Jonathan Ball en la University of Nottingham, Reino Unido por el Dr. José Humberto Oláis y el Dr. Fernando Ruiz Jiménez.

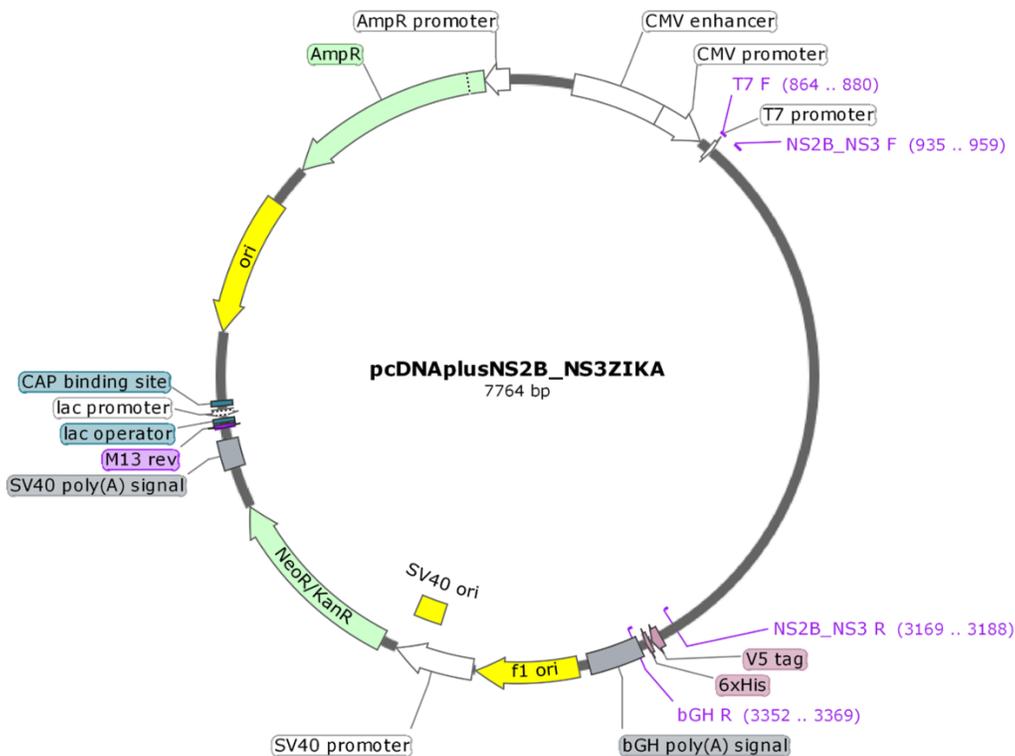


Figura 5. Plásmido pcDNAplus con inserto de NS2B3 o NS2B3-S135 de ZIKV. El inserto de NS2B3 o NS2B-S135, se encuentra en la posición 935-3188, validado por secuenciación. El plásmido contiene un promotor para procarionte con resistencia a ampicilina y un promotor de Citomegalovirus para eucarionte. Además, contiene una bandera de V5, útil para la localización de NS2B3 y NS2B-S135.

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

La propagación de los plásmidos se hizo en bacterias *E. coli* DH5 α competentes. Para ello, las bacterias se cultivaron en medio LB a 37 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5, a continuación, se colectaron por centrifugación (5 min a 4000 g a 4 °C), se resuspendieron en amortiguador TFB1 (RbCl 100 mM, 2H₂O MnCl₂ 50 mM, CH₃CO₂K 30 mM, CaCl₂ 10 mM, Glicerol 15%) en una proporción 1:3. Las bacterias se incubaron por 90 min en hielo, se colectaron las células por centrifugación (5 min a 4000 xg a 4 °C), y se resuspendieron en 4 ml de TFB2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75m M, Glicerol 15%). Se hicieron alícuotas de 100 μ l y se guardaron a -70 °C hasta su uso.

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

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

Mutación de la NLS-putativa de la proteína NS3

El plásmido que contiene la secuencia NS2B3, gentilmente donado por el Dr. Jonathan Ball de la Universidad de Nottingham, Reino Unido, se propagó en *E. coli* DH5α competente y se purificó utilizando el kit Zyppy Plasmid Miniprep (ZYMO Research), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

La mutación de la NLS-putativa de la proteína NS3 se realizó en el plásmido de NS2B3 con el kit Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase PCR (New England Biolabs), utilizando el par de cebadores: forward agcaCTCCGTACTGTGATCTTAG y reverse gctgcTATGGCTTCACGGACTATTTTC, y las recomendaciones del fabricante (98 °C por 30 s, 25 ciclos de 98 °C por 10 s, 60 °C por 20 s, 72 °C por 1 min).

Transfección de células Huh7 con el plásmido que codifica a NS2B-NS3 o a la NLS del SV40-tetraGFP.

Las células Huh7 a una confluencia del 70-80 % se transfectaron con cada uno de los plásmidos mediante electroporación siguiendo el protocolo de Hashemi et al., 2012 con algunas modificaciones (Hashemi et al., 2012). Brevemente, se lavaron 1×10^7 células con PBS y se resuspendieron en 200 μ l de medio OptiMem con 5 μ g de DNA. Las células se transfirieron a una cubeta Gene Pulser con un espacio entre electrodos de 4 mm.

La electroporación se realizó en un Gene Pulser Xcell (BioRad, Alemania), intensidad de campo eléctrico y longitud de pulso de 170 V y 40 ms en decaimiento exponencial. Las células se cultivaron en medio DMEM Advanced con FBS al 15 % y la transfección se evaluó a las 48 h.

Preparación de extractos de proteínas totales

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

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

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

Transferencia a membrana de nitrocelulosa

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

Western Blot

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

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

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

Inmunofluorescencia

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

Ab	Hospedero	Dilución	Fabricante	# catalogo
α-CRM-1	ratón	1:100	Santa Cruz	SC-74454
α-hnRNP-A1	ratón	1:100	Santa Cruz	SC-32301
α-hnRNP-K	ratón	1:100	Santa Cruz	SC-28380
α-SR proteins	ratón	1:100	Santa Cruz	SC-13509
α-NS3 DENV	conejo	1:300	GeneTex	GTX124252

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

Las células se lavaron 3 veces con 50 mM de NH₄Cl en PBS 1X y una más con agua destilada para eliminar el exceso de sales. Las preparaciones se

montaron con VECTASHIELD Mounting Medium y se almacenaron a 4 °C, hasta su observación en el microscopio confocal Leica TCS SP8. Las imágenes obtenidas bajo el microscopio se procesaron con el software Leica Application Suite X Core Offline version 3.3.0 for Windows 10.

Ensayo de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para detección de mRNAs

Para detectar la localización subcelular de los mRNAs poliadenilados, se realizó un ensayo de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Células Huh-7 transfectadas con los plásmidos NS2B-NS3 o NS2B-NS3 S135A por 48 hpt, infectadas con ZIKV por 48 hpi o no infectadas se fijaron con formaldehído al 4% durante 20 minutos. Se aspiró el formaldehído y se añadió metanol frío a cada muestra durante 10 min. Posteriormente, se aspiró el metanol y se añadió etanol al 70% durante 10 mín. Finalmente, se aspiró el etanol y se añadió Tris 1M pH 8,0 durante 5 min.

Después se bloqueó de las células con BSA al 0,5% durante 20 min, la sonda Cy5-Oligo-dT diluida en tampón de hibridación a una concentración final de 1 ng/mL (1 mg/mL de ARNt de levadura, EDTA 0,5 mM, BSA al 0,5 %, sulfato de dextrano al 10 % y formamida al 25 % desionizada), se añadió y se incubó durante 12 horas a 37°C. Las células se lavaron 5 veces con 4X SSC buffer y 5 veces con 2X SSC buffer. El anticuerpo anti-NS3 de conejo (1 µg/ml) se diluyó en 2X SSC con 0,1% Triton X-100 y se incubó durante la noche a 4°C.

Las células se lavaron 5 veces con 2X SSC y se incubaron con 1 µg/ml de AlexaFluor IgG anti-conejo de cabra conjugada con 555. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (Santa Cruz Biotecnología, Santa Cruz, CA).

Ensayos de microscopía inmunoelectrónica de transmisión (TIM)

Las células Huh7 cultivadas en matraces T-75 (Corning) se infectaron de forma simulada (mock) o con ZIKV a una MOI de 3. Después de 8 y 24 h, las células

se fijaron con paraformaldehído al 4 %/glutaraldehído al 0,5 % durante 1 hora a temperatura ambiente (RT), deshidratado con concentraciones crecientes de etanol, se incluyó en la resina acrílica (LR White) y se polimerizó bajo radiación UV a 4°C durante la noche. Secciones de células incrustadas en resina de 70 nm de grosor se montaron en rejillas de níquel cubiertas con Formvar y se incubaron en PBS con FBS al 10 % durante 1 h para bloquear las uniones no específicas, las muestras fueron incubadas con anticuerpo anti-NS3 diluido 1:20 en PBS con FBS al 5 %. Las muestras se lavaron tres veces con PBS 10 % FBS y se incubaron con anticuerpo secundario IgG anti-conejo conjugado con partículas de oro coloidal de 20 nm (Ted Pella Inc., Redding, CA, EE. UU.) a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, las secciones se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo antes de ser examinadas bajo un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011 (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

Predicción *in silico* de NLS o NES de la proteína NS3 de ZIKV y otros Flavivirus

La secuencia de aminoácidos de la proteína NS3 de la cepa ZIKV Mr-766 (número de acceso: Q32ZE1) se obtuvo de UniProt KnowledgeBase (UniProtKB). La NLS de la proteína NS3 de ZIKV se identificó usando el software cNLS Mapper (servidor enfocado en la predicción de señales de localización nuclear dependientes de importina α) (Kosugi, Hasebe, Tomita, et al., 2009) con un puntaje de corte predeterminado (5.0), mientras que para la predicción de NES se usó el LocNES un herramienta computacional para localizar NES clásicas en proteínas que usan la vía de exportina CRM-1 (Xu et al., 2015). Además, los motivos TRG_NLS_MonoExtN_4 y TRG_NES_CRM1_1 se determinaron con WREGEX (expresión regular ponderada) v2.1, un servidor para la búsqueda de motivos de aminoácidos (Prieto et al., 2014). Para comparar si las secuencias de localización nuclear putativas de la proteína NS3 eran conservadas entre los flavivirus. Además,

se realizó una alineación de secuencias múltiples utilizando ClustalW. Las secuencias de la proteína NS3 de varios flavivirus utilizados con UniProtKB ID fueron: DENV (P14340), LANTV (P29837), YFV (Q6J3P1), DENV4 (Q58HT7), DENV1 (P27909), DENV3 (Q6YMS4), WNV (Q9Q6P4), JEV (P27395).

Modelado 3D de la proteína NS3 de ZIKV y acoplamiento molecular de NS3-Importin α

La secuencia de aminoácidos de la proteína NS3 de la cepa ZIKV Mr-766 (número de acceso: Q32ZE) se recopiló de UniProt Knowledge base (UniProtKB) y se usó para la predicción de estructura 3D realizada con RaptorX [62] y se analizó con VMD v1.9.3 software. La validación se realizó utilizando el gráfico de Ramachandran y el servidor SAVES v6.0. El 91 % de los aminoácidos se encontraban en el área permitida de los ángulos psi y phi (0,2) (valores no mostrados).

El acoplamiento molecular de NS3-Importina α se analizó con el servidor HDOCK usando el NS3 de ZIKV previamente modelado y la estructura de Importina α (PDB ID: 4WV6). Como controles positivos se utilizaron la NLS de la proteína NS5 de ZIKV (PDB ID: 5W41), y la NLS del SV40 (1EJL), ya que ambos utilizan la vía clásica de importación nuclear. La proteína citoplasmática ATP sintasa α (PDB ID: 1QO1) y la proteína de membrana celular Fas-L miembro 6 (PDB ID: 5L19) que carecen de NLS se usaron como controles negativos.

Viabilidad celular a IVM y LMB

La viabilidad celular en presencia de IVM y LMB se evaluó con el método MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol). Brevemente, las células Huh-7 se cultivaron en placas de 96 pocillos (70-80% de confluencia). Posteriormente, se trataron durante 48h a 37°C con los vehículos (DMSO y etanol), y los fármacos a diferentes concentraciones. IVM (12, 25, 50, 75 y 100

μM) o LMB (1, 3 y 5 ng). Se agregaron 10 μL de MTT en 100 μL de medio de cultivo por pocillo y se incubó durante 3h a 37°C, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se eliminó el MTT y se agregaron 100 μL de DMSO por pocillo. Para eliminar el fondo, la placa se leyó a una longitud de onda de 630 nm y las absorbancias obtenidas se restaron de las absorbancias obtenidas con una longitud de onda de 562 nm. La lectura se realizó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm.

Inhibición de la importación nuclear clásica (Importin alfa/beta) con IVM e inhibición de la exportación nuclear (CRM-1) con LMB

Las células Huh7 cultivadas con DMEM/FBS al 7,5 % (v/v) se pretrataron durante 4 h con IVM 15, 20 o 25 μM (SIGMA 18898-250MG) diluido en DMSO, que inhibe la importación de proteínas al núcleo a través de la importina α/β 1. Posteriormente, las células se infectaron de forma simulada o se infectaron con ZIKV a una MOI de 3 durante dos horas a 37° C con 5 % de CO₂ en medio DMEM avanzado sin suero, luego se retiró el medio y se colocó un medio fresco completo (Wagstaff et al., 2012), y se permitió la infección por 12 h.

Por otro lado, para el tratamiento con LMB, que inhibe la exportación nuclear de CRM-1, las células se trataron con 5, 10 o 15 nM de LMB diluido en etanol (Santa Cruz CAS 87081-35-4). Las células en el medio de cultivo se trataron inmediatamente después de la infección con LMB (Rawlinson et al., 2009). Se permitió la infección durante 24 horas.

La localización de la proteína NS3 en las células infectadas con ZIKV y tratadas con IVM o LMB se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta.

Análisis de imágenes y análisis estadístico

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal se analizaron utilizando el software de análisis de imágenes Icy. Se importaron tres imágenes diferentes para cada condición (8, 12, 16, 24 y 48 horas o NS2B3 WT/Mut-NLS según

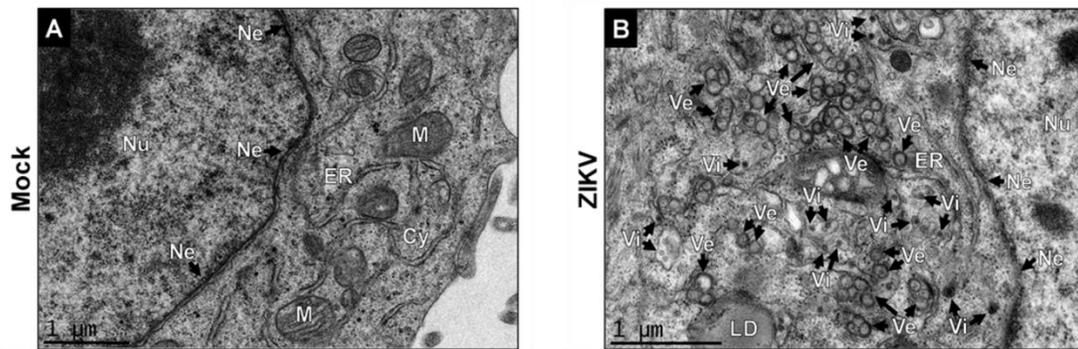
corresponda) y se obtuvo la intensidad de fluorescencia media (MFI) para los valores de píxeles para cada región de interés seleccionada (ROI) para cuantificar la fluorescencia nuclear (Fn) en relación con la fluorescencia del citoplasma (Fc). La relación Fn/Fc se determinó de acuerdo con $F_n/F_c = (F_n - F_b)/(F_c - F_b)$, donde Fb era la fluorescencia de fondo negro (Lopez-Denman et al., 2018).

Además, como parte del análisis de imágenes, se determinó el coeficiente de correlación de Pearson entre la proteína NS3 (Alexa-Fluor 555) y los núcleos (Hoechst) para regiones de interés seleccionadas. Las unidades arbitrarias de MFI y los coeficientes de correlación se expresaron como medias y se determinó el error estándar de la media (SEM). Se utilizó el análisis de ANOVA ordinario de una vía con la prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Dunnett para determinar las diferencias significativas entre las medias de cada condición (12, 16, 24 y 48 horas o NS2B3 Mut-NLS como se indica) contra el control (8 h) o NS2B3 WT, utilizando el software Rstudio versión 1.4 y R versión 4.1. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando los valores de p bilaterales fueron $< 0,05$.

Resultados

La infección por ZIKV induce cambios en la envoltura nuclear

Aunque la replicación de los miembros del género *Flavivirus* ocurre en el citoplasma, algunas proteínas virales son transportadas al núcleo donde juegan un papel esencial durante la replicación viral (Hertzog et al., 2018; Hou et al., 2017; Wang et al., 2017). En este sentido, las proteínas virales requieren atravesar la envoltura nuclear (Ne) para ingresar al núcleo de las células huésped. Por esta razón, la integridad de Ne durante la infección por ZIKV se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se observó un conjunto de invaginaciones de la membrana del retículo endoplásmico (ER), características de las células infectadas, que incluyen vesículas inducidas por virus (Ve) y paquetes de vesículas (Vp) conocidos como complejos de replicación viral (Cortese et al., 2017) en células Huh-7 infectadas con ZIKV (**Figura 6**).



C

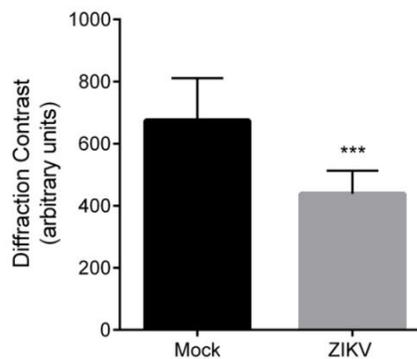


Figura 6. La infección por el virus del Zika (ZIKV) disrumpe la integridad envoltura nuclear de las células Huh-7. Microscopía electrónica de transmisión de (A) células sin infección (Mock) o (B) células infectadas con ZIKV durante 24 h. (C) Los gráficos representan los resultados del contraste de difracción expresados como unidades arbitrarias y las barras de error muestran la SD de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$, $n = 10$ por grupo. Ne, envoltura nuclear; Nu, núcleo; RE, retículo endoplásmico; VE, vesículas de doble membrana; LD, gotas de lípidos.

Además, se detectaron partículas similares a virus (Vi), pequeñas esferas electrodensas con la morfología y el tamaño de las partículas virales dentro de las cisternas del ER distendidas, lo que confirma la infección por ZIKV y la producción de progenie viral (**Figura 6**). El análisis ultraestructural evidenció cambios en la morfología nuclear de las células infectadas por ZIKV donde la Ne estaba distendida y tenía una marcada ausencia de densidad electrónica en contraste con la Ne de las células infectadas de forma simulada (**Figura 6**). Este resultado sugiere que la infección por ZIKV conduce a la pérdida de la integridad del Ne como ocurre en enfermedades hereditarias y adquiridas (Robijns et al., 2018).

La infección por ZIKV altera la composición del NPC

Durante mi trabajo de tesis de maestría encontramos que en la infección por ZIKV se produce una reubicación citoplasmática y una aparente pérdida de integridad de Nup98, Nup153 y TPR, pero no de Nup62.

Durante mi trabajo de doctorado, para investigar el tiempo específico en el que ZIKV altera la integridad de las nucleoporinas, se analizó la integridad de Nups en diferentes momentos de la infección (12, 24 y 48 hpi) mediante Western blot. Después de 12 hpi, las cantidades de TPR y Nup98 disminuyen de manera dependiente del tiempo en las células infectadas por ZIKV en comparación con las células sin infección (Mock) (**Figura 7A y B**), lo que correlaciona con la cantidad de proteína viral detectada que aumenta con el tiempo (12, 24 y 48 hpi). En contraste con la cantidad de Nup62, que no se

observó que cambiara en diferentes momentos de la infección por ZIKV, como ocurre en las células Huh-7 no infectadas (**Figura 7C**). La cantidad de Nup153 disminuyó a las 12 y 24 hpi en comparación con las células no infectadas, sin embargo, se observó un aumento a las 48 hpi (**Figura 7A**). Estos resultados fueron consistentes con las observaciones realizadas por análisis de microscopía confocal en células Huh-7 infectadas con ZIKV durante 24 h.

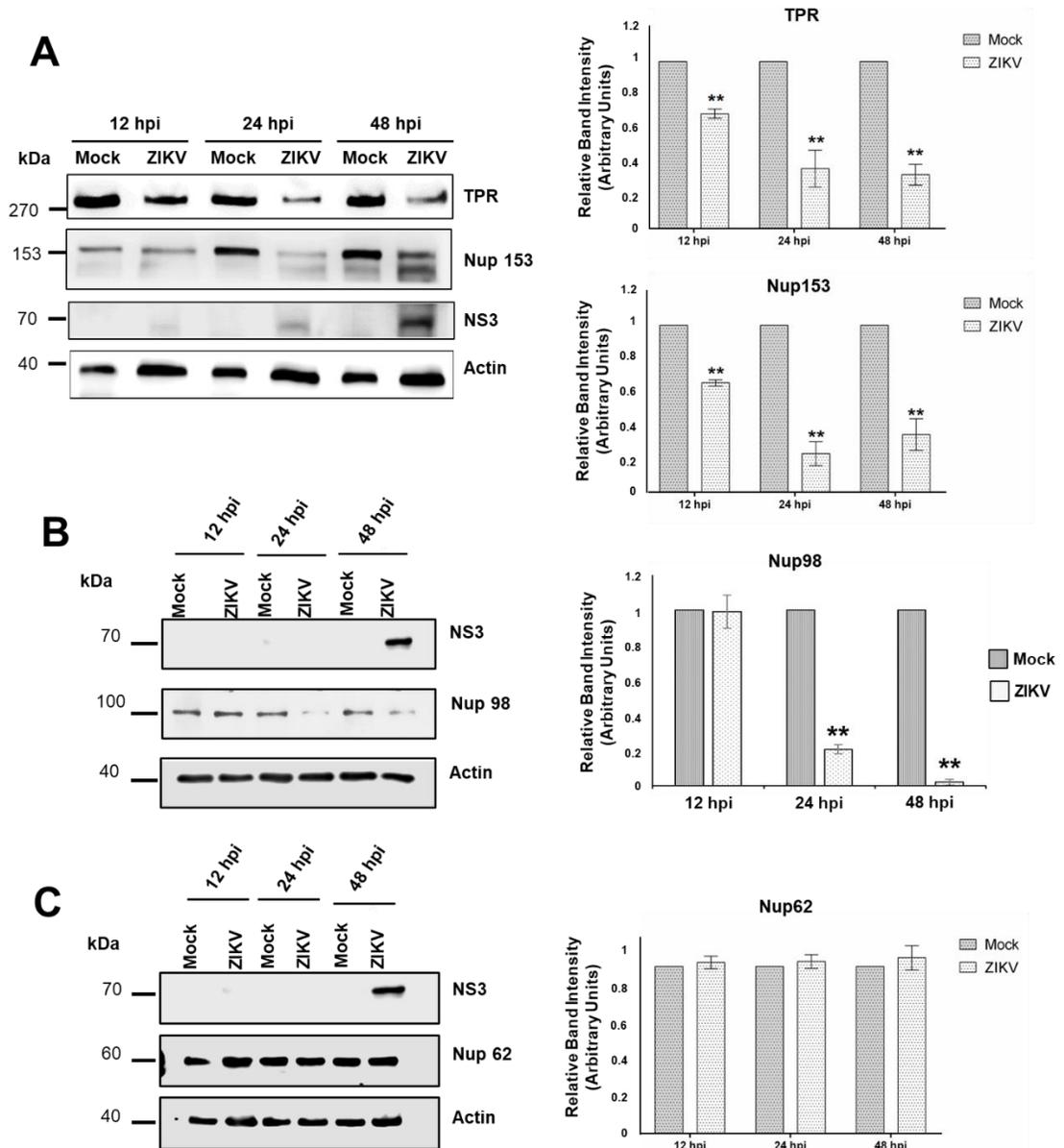


Figura 7. Las nucleoporinas TPR, Nup153 y Nup98 se procesan durante la infección por ZIKV. Los niveles de proteína de (A) TPR, Nup153, (B) Nup98 y (C) Nup62 se analizaron

mediante transferencia Western en lisados de células completas de células simuladas o infectadas con ZIKV durante 12, 24 y 48 horas. El anticuerpo anti-NS3 se usó como control de infección y anti-actina como control de carga. Se presentan ensayos de Western blot representativos de tres experimentos independientes. El gráfico representa los niveles de proteína en comparación con la β -actina. Los valores de la cantidad de proteína del control (simuladamente infectados) se ajustaron a un valor de 1. Los valores para la expresión en células infectadas (blancas) se expresaron luego como un número relativo al control. Los datos son medias \pm SEM de $n = 3$ experimentos independientes realizados por duplicado.

La proteasa NS2B-NS3 de ZIKV altera la integridad de la NPC al alterar las nucleoporinas Nup98, Nup153 y TPR

Dado que se ha reportado ampliamente que las proteasas virales pueden degradar a nucleoporinas como Nup62, Nup98, Nup153 y TPR y con ello modificar al NPC (Faria et al., 2005; Gustin & Sarnow, 2002a; Huang et al., 2015; Malik et al., 2012; Park et al., 2008a; Watters & Palmenberg, 2011a), decidimos analizar si la proteasa ZIKV NS2B-NS3 participa en el procesamiento de estas Nups. Al analizar por Western blot las cantidades de Nups en células Huh-7 transfectadas con plásmidos que contenían la secuencia activa (NS2-NS3B3) o inactiva (NS2B3-S135A) de la proteasa ZIKV o de células infectadas por ZIKV observamos una reducción significativa en la cantidad de Nup98, Nup153 y TPR (**Figura 8A y B**) de células transfectadas con la proteasa ZIKV activa y células infectadas con ZIKV ($p = < 0,05$) en contraste con células sin infección. Apoyando la idea de que la proteasa ZIKV es responsable de la degradación de Nup98, Nup153 y TPR. Sin embargo, la cantidad de Nup62 fue la misma en las células Huh-7 transfectadas con proteasa de ZIKV activa o inactiva, células Huh-7 infectadas por ZIKV y simuladamente infectadas (**Figura 8A**). Este hallazgo fue concordante con la señal de etiquetado específica para Nup62, ya que la cantidad de Nup62 fue la misma a las 12, 24 y 48 hpi en células Huh-7 infectadas con ZIKV y con infección simulada (**Figura 7C**), lo que sugiere que la proteasa de ZIKV a diferencia de las otras NUPs estudiadas, no alteró a la Nup62.

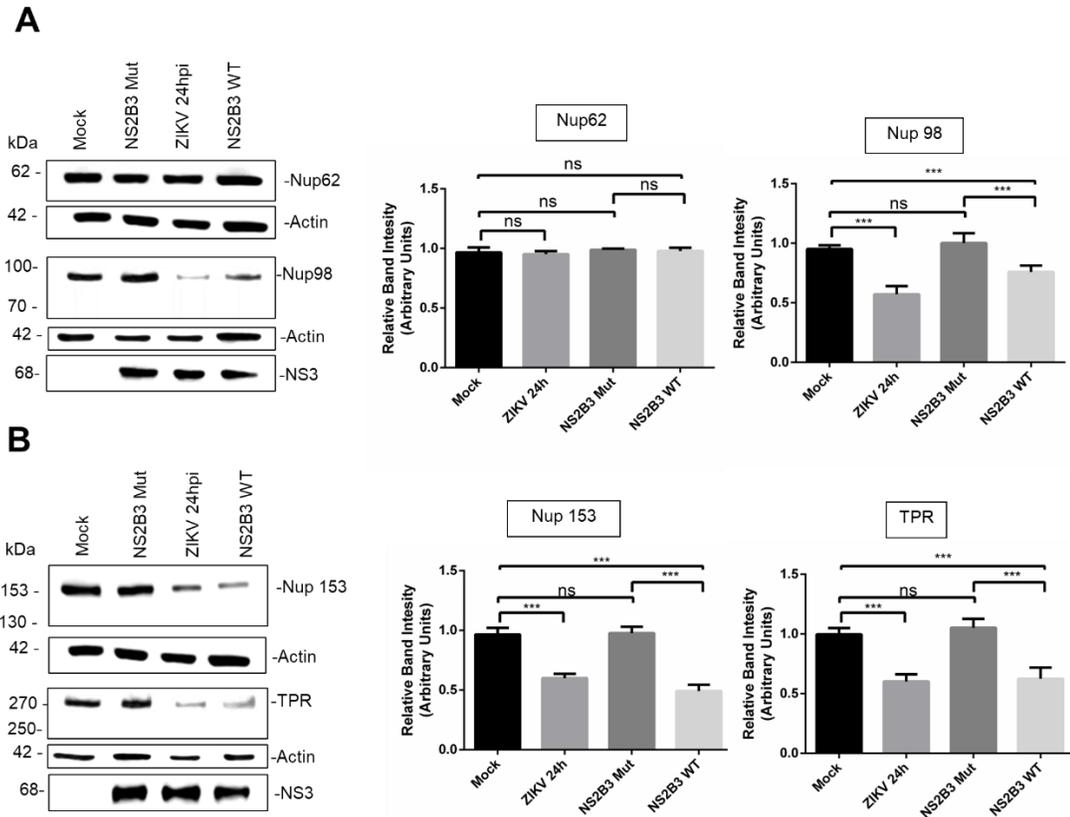


Figura 8. La proteasa NS2B3 activa de ZIKV altera la integridad de Nup98, Nup153 y TPR, pero no la de Nup-62. (A) Células Huh-7 sin infección (Mock) o infectadas con ZIKV o transfectadas con la forma activa (WT) o inactiva (mutante) de la proteasa NS2B3 durante 48 horas se incubaron con (A) anti-Nup62, anti-Nup98, (B) anti-Nup153 y anti-TPR y analizado por Western blot. El anticuerpo anti-NS3 se usó como control de infección y anti-actina como control de carga. Se presentan ensayos de Western blot representativos de tres experimentos independientes. El gráfico representa los niveles de Nup62 y Nup98 en comparación con la β -actina. Los valores de cantidad de proteína del control (simuladamente infectados) se ajustaron a un valor de 1. Los valores para la expresión en células infectadas (blancas) se expresaron luego como un número relativo al control. Los datos son medias \pm error estándar (S.E) de $n = 3$ experimentos independientes realizados por duplicado. *** $p \leq 0,001$, ns: sin diferencia significativa.

La infección con ZIKV altera la localización subcelular de proteínas reporteras que contienen secuencias de transporte núcleo-citoplasma.

Además de la internalización de proteínas virales en el núcleo durante las infecciones por flavivirus, algunos componentes nucleares son secuestrados para evitar la respuesta inmune antiviral. La presencia de la polimerasa NS5 de WNV, DENV y JEV en el núcleo interviene en la vía de respuesta de IFN en diferentes niveles de la vía de señalización JAK/STAT y, por lo tanto, evita la entrada de factores de transcripción en el núcleo para evitar la respuesta inmunitaria innata (Ashour et al., 2009; Laurent-Rolle et al., 2010; Lin et al., 2006; Mazzon et al., 2009).

Por otro lado, proteínas nucleares como La (DENV), PTB (DENV), RNA Helicasa A, TIA1/TIAR (WNV) y Tudor-DN/p100 (DENV) migran al citoplasma para participar en el ensamblaje de los maquinaria de replicación viral (Agis-Juárez et al., 2009, p.; De Nova-Ocampo et al., 2002; Emara et al., 2008; García-Montalvo et al., 2004). Además, en esta tesis describimos la alteración del NPC por escisión de Nups por la NS3 de ZIKV. Por ello, el núcleo y componentes de este son cruciales para la replicación viral

Se han descrito alteraciones del NPC durante otras infecciones virales debido a la escisión específica de Nups por proteasas de virus citoplasmáticos como las de Poliovirus y Rinovirus. Esta degradación o procesamiento de Nups da como resultado la alteración del transporte núcleo-citoplasmático de proteínas y ARNm, con el fin de secuestrar la maquinaria de traducción para la replicación viral y el control de la respuesta inmune antiviral (Castelló et al., 2009b; Gustin & Sarnow, 2001b; Park et al., 2010).

Para analizar la funcionalidad de las vías de importe/exporte nuclear durante la infección con ZIKV, analizamos la localización subcelular de proteínas reporteras que participan activamente en el transporte nuclear o que contienen secuencias de importe/exporte nuclear.

La funcionalidad de la vía clásica de importe nuclear se analizó mediante la localización de Importina α durante la infección con ZIKV a las 48 hpi, ya que

anteriormente observamos que en esta etapa de la infección las Nups se encontraban mayormente afectadas por NS3.

Podemos observar que la infección con ZIKV altera la localización y cantidad de Importina α (**Figura 9**); por un lado, observamos que la Importina α durante la infección con ZIKV se localiza mayormente en el citoplasma, contrario a las células sin infectar en las cuales la Importina α se localiza en citoplasma y núcleo. Además, encontramos una disminución en la cantidad de la Importina α durante la infección con ZIKV (**Figura 9A y B**). La diferencia en la Importina α en la fracción nuclear y citoplasmática, demostró que, en las células sin infección la Importina α se localiza principalmente en el núcleo, contrario a las células infectadas con ZIKV (**Figura 9C**).

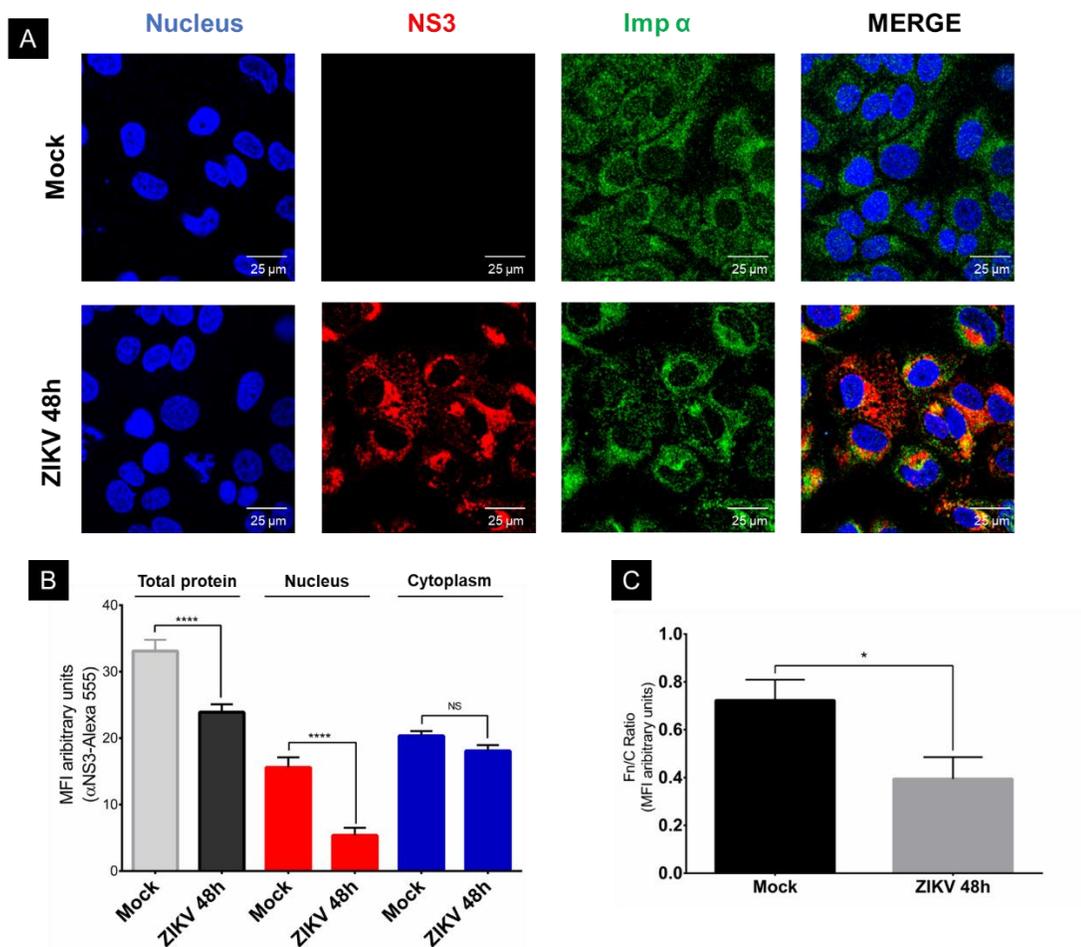


Figura 9. La infección con ZIKV altera la localización subcelular de importina α . (A) La ubicación de la importina α y la proteína viral NS3 en células Huh7 sin infección o células Huh7

infectadas con ZIKV a las 48 h después de la infección (hpi) se analizó mediante microscopía confocal usando anti-NS3 (rojo) y anticuerpos anti-imp α (verde) y tinción de Hoechst de núcleos (azul). Para determinar la localización nuclear o citoplasmática de importina α , se analizaron imágenes de cortes tridimensionales, como se menciona en la metodología. (B) Se determinó el MFI para regiones seleccionadas de interés en el núcleo y el citoplasma, y la proteína celular total (30 células por condición) y (C) Se determinó la relación Fn/Fc para estas regiones seleccionadas de interés en cada imagen de microscopía confocal de inmunofluorescencia. *, $p = 0,05$; **, $p = 0,001$; ***, $p = 0,0001$; ****, $p < 0,0001$.

Para analizar la funcionalidad de la vía clásica de exporte nuclear se analizó la localización de la exportina CRM-1 durante la infección con ZIKV a las 48 hpi. Podemos observar que la infección con ZIKV también altera la localización y cantidad de la exportina CRM-1 (**Figura 10**), ya que CRM-1 durante la infección con ZIKV se localiza mayormente en el núcleo, contrario a las células sin infectar, donde CRM-1 se localiza en núcleo y citoplasma. Además, encontramos una disminución en la cantidad de CRM-1 durante la infección con ZIKV (**Figura 10A y B**). La diferencia núcleo/citoplasma de CRM-1, demostró que durante la infección con ZIKV se localiza principalmente en el núcleo, contrario a las células sin infección (**Figura 10C**).

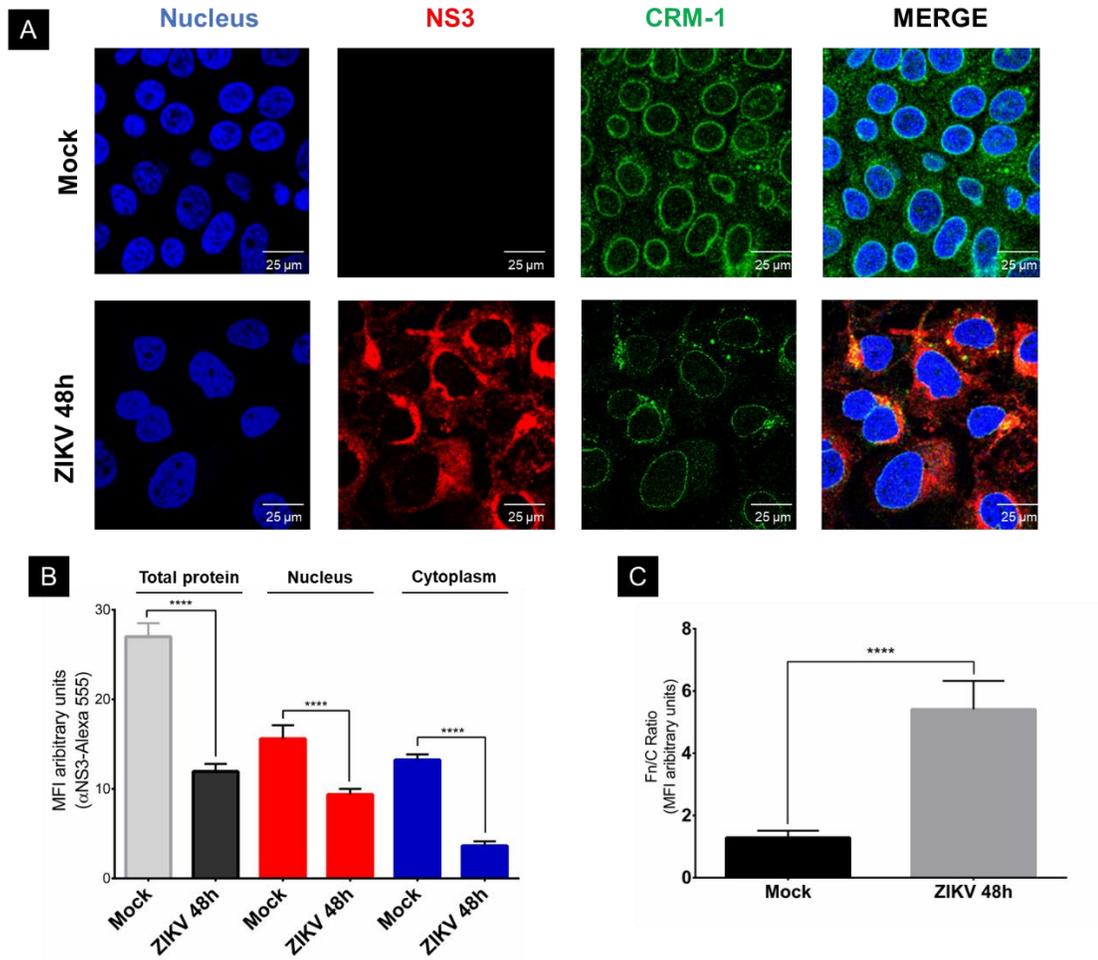


Figura 10. La infección con ZIKV altera la localización subcelular de la exportina CRM-1. (A) La ubicación de CRM-1 y la proteína viral NS3 en células Huh7 sin infección o células Huh7 infectadas con ZIKV a las 48 h después de la infección (hpi) se analizó mediante microscopía confocal usando anti-NS3 (rojo) y anticuerpos anti-CRM-1 (verde) y tinción de Hoechst de núcleos (azul). Para determinar la localización nuclear o citoplasmática de CRM-1, se analizaron imágenes de cortes tridimensionales, como se menciona en la metodología. (B) Se determinó el MFI para regiones seleccionadas de interés en el núcleo y el citoplasma, y la proteína celular total (30 células por condición) y (C) Se determinó la relación Fn/Fc para estas regiones seleccionadas de interés en cada imagen de microscopía confocal de inmunofluorescencia. *, $p = 0,05$; **, $p = 0,001$; ***, $p = 0,0001$; ****, $p < 0,0001$.

Por otro lado, se analizaron las vías de transporte no clásicas, como la mediada por la transportina 1 durante la infección. La transportina 1 participa en el transporte bidireccional de proteínas que contienen la secuencia M9-NLS

(también llamada PY-NLS), presente en proteínas como la ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1 (hnRNP A1), y algunas otras involucradas en la unión, transcripción o procesamiento del RNA (Twyffels et al., 2014).

El análisis de hnRNP A1 durante la infección con ZIKV demostró la alteración de su localización y cantidad (**Figura 11**), ya que durante la infección con ZIKV se localiza principalmente en el citoplasma, contrario a las células sin infección donde se localiza principalmente en núcleo. Además, encontramos una disminución en la cantidad de hnRNP A1 durante la infección con ZIKV (**Figura 11A y B**). La diferencia núcleo/citoplasma de esta proteína celular, demostró que en las células sin infectar se localiza principalmente en el núcleo, contrario a las células infectadas con ZIKV (**Figura 11C**).

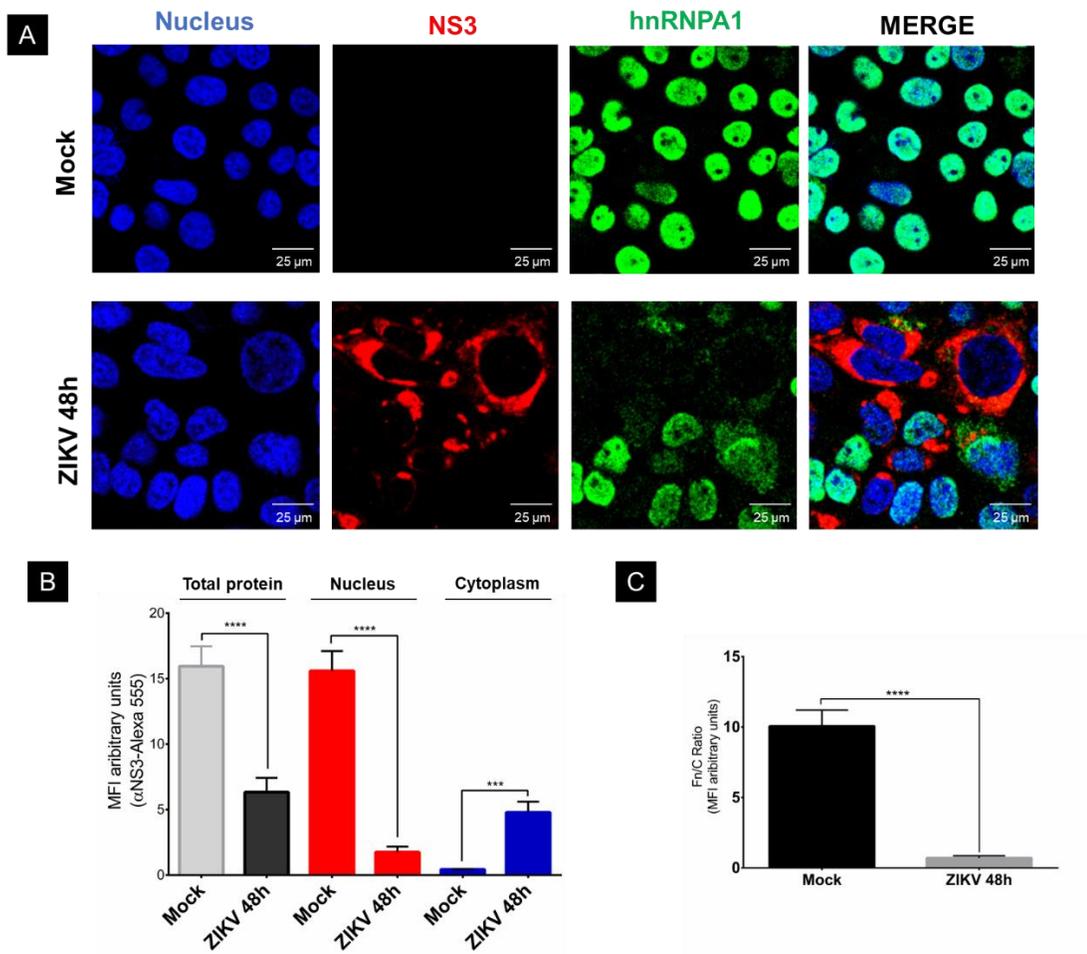


Figura 11. La infección con ZIKV altera la localización subcelular de la hnRNP A1 contiene secuencias de transporte núcleo-citoplasma (A) La ubicación de la hnRNP A1 y la proteína viral NS3 en células Huh7 sin infección o células Huh7 infectadas con ZIKV a las 48 h después de la infección (hpi) se analizó mediante microscopía confocal usando anti-NS3 (rojo) y anticuerpos anti-hnRNP A1 (verde) y tinción de Hoechst de núcleos (azul). Para determinar la localización nuclear o citoplasmática de hnRNP A1, se analizaron imágenes de cortes tridimensionales, como se menciona en la metodología. (B) Se determinó el MFI para regiones seleccionadas de interés en el núcleo y el citoplasma, y la proteína celular total (30 células por condición) y (C) Se determinó la relación Fn/Fc para estas regiones seleccionadas de interés en cada imagen de microscopía confocal de inmunofluorescencia. *, $p = 0,05$; **, $p = 0,001$; ***, $p = 0,0001$; ****, $p < 0,0001$.

Además, se utilizó la localización subcelular de proteínas que utilizan diferentes rutas de transporte como la hnRNP K que utiliza el transporte nuclear K (mediado por la señal KNS) (Görlich & Kutay, 1999). Al igual que la hnRNP A1, se demostró la alteración de la localización de la hnRNP K ya que durante la infección con ZIKV hnRNP K se localiza en las fracciones nuclear y citoplasmática, contrario a las células sin infección donde se localiza principalmente en el núcleo (**Figura 12**). Además, encontramos una disminución en la cantidad de hnRNP K durante la infección con ZIKV (**Figura 12A y B**). La diferencia núcleo/citoplasma de hnRNP K, demostró que en las células sin infección se localiza principalmente en el núcleo, contrario a las células infectadas con ZIKV (**Figura 12C**).

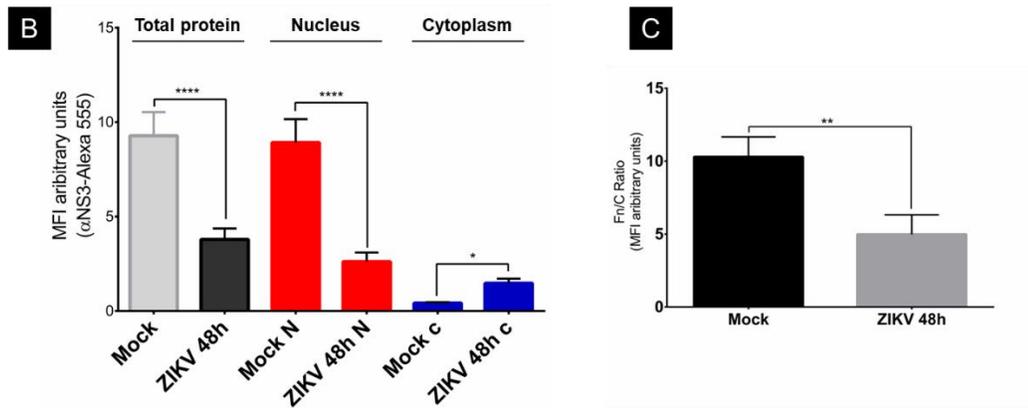
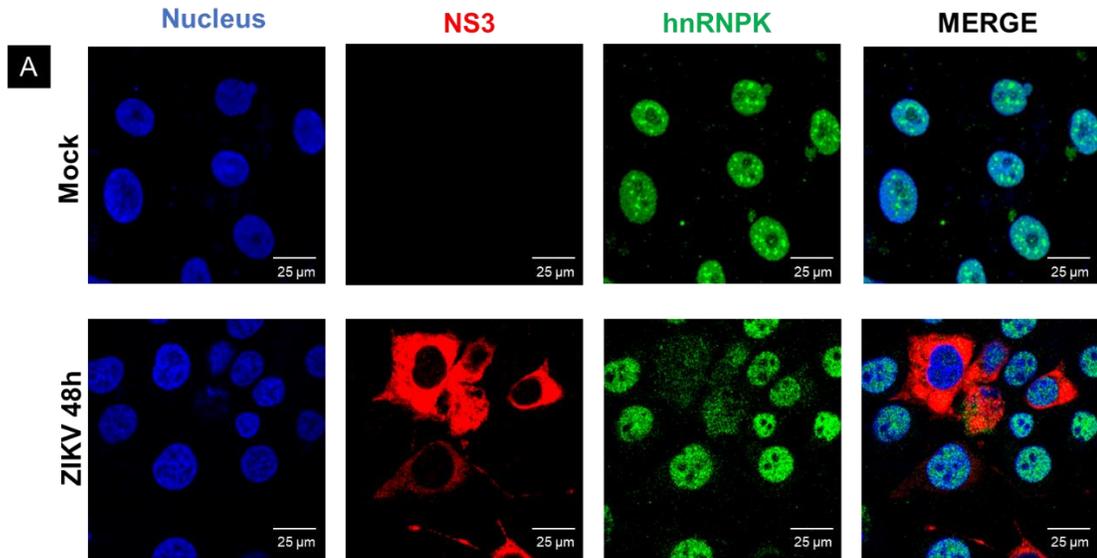


Figura 12. La infección con ZIKV altera la localización subcelular de hnRNP K contiene secuencias de transporte núcleo-citoplasma (A) La ubicación de la hnRNP K y la proteína viral NS3 en células Huh7 sin infección o células Huh7 infectadas con ZIKV a las 48 h después de la infección (hpi) se analizó mediante microscopía confocal usando anti-NS3 (rojo) y anticuerpos anti-hnRNP K (verde) y tinción de Hoechst de núcleos (azul). Para determinar la localización nuclear o citoplasmática de hnRNP K, se analizaron imágenes de cortes tridimensionales, como se menciona en la metodología. (B) Se determinó el MFI para regiones seleccionadas de interés en el núcleo y el citoplasma, y la proteína celular total (30 células por condición) y (C) Se determinó la relación F_n/F_c para estas regiones seleccionadas de interés en cada imagen de microscopía confocal de inmunofluorescencia. *, p = 0,05; **, p = 0,001; ***, p = 0,0001; ****, p < 0,0001.

Aunque que durante la infección con Poliovirus, la vía bidireccional de transportina SR no se vio alterada (Gustin & Sarnow, 2001b), nosotros analizamos esta vía utilizando un anticuerpo dirigido contra las proteínas con repetidos Ser y Arg (proteínas SR) que funciona como una NLS para esta vía. Un ejemplo de ello es el factor de empalme SC35 (Cazalla et al., 2002). Podemos observar que la infección con ZIKV altera la localización y cantidad de las proteínas SR (**Figura 13**), ya que CRM-1 durante la infección con ZIKV altera principalmente la cantidad de las proteínas SR. Sin embargo, también afecta la localización de estas al encontrarse en ambas fracciones (nuclear y citoplasmática), contrario a las células sin infectar donde las proteínas SR se localizan en el núcleo. Además, encontramos una disminución en la cantidad de las proteínas SR durante la infección con ZIKV (**Figura 13A y B**). La diferencia núcleo/citoplasma de las proteínas SR, demostró que durante la infección con ZIKV estas proteínas se localizan en menor grado en el núcleo, respecto a las células sin infección (**Figura 13C**).

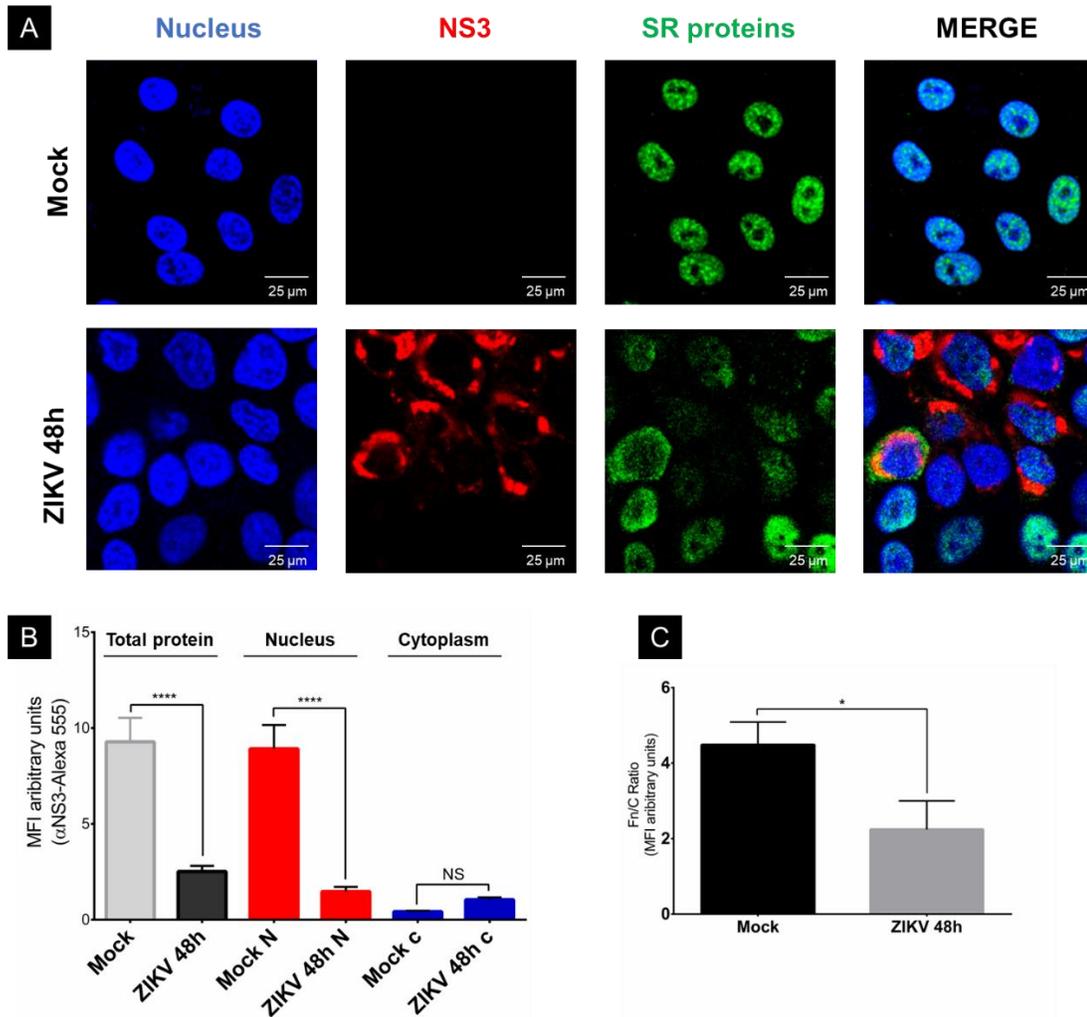


Figura 13. La infección con ZIKV altera la localización subcelular de las proteínas SR que contienen secuencias de transporte núcleo-citoplasma (A) La ubicación de las proteínas SR y la proteína viral NS3 en células Huh7 sin infección o células Huh7 infectadas con ZIKV a las 48 h después de la infección (hpi) se analizó mediante microscopía confocal usando anti-NS3 (rojo) y anticuerpos anti-proteínas SR (verde) y tinción de Hoechst de núcleos (azul). Para determinar la localización nuclear o citoplasmática de las proteínas SR, se analizaron imágenes de cortes tridimensionales, como se menciona en la metodología. (B) Se determinó el MFI para regiones seleccionadas de interés en el núcleo y el citoplasma, y la proteína celular total (30 células por condición) y (C) Se determinó la relación Fr/Fc para estas regiones seleccionadas de interés en cada imagen de microscopía confocal de inmunofluorescencia. *, $p = 0,05$; **, $p = 0,001$; ***, $p = 0,0001$; ****, $p < 0,0001$.

Estos resultados demuestran que las vías de Importina α , exportina CRM-1, Transportina 1, Transportina KNS y Transportina SR se ven afectadas durante la infección con ZIKV.

La proteasa NS2B-NS3 de ZIKV altera el transporte de mRNAs

Hasta ahora, nuestros resultados indican que durante la infección con ZIKV, se procesan Nups y que este procesamiento altera el tráfico núcleo-citoplasma, como ha sido reportado para otros virus (Castelló et al., 2009b; Gustin & Sarnow, 2001b, 2002b). Se ha descrito que Nup98, Nup153 y TPR que son escindidos por la proteasa NS2B-NS3 de ZIKV, están involucrados en el transporte de mRNAs maduros (Aksenova et al., 2020; Y. Li et al., 2021; Ren et al., 2010, p. 1).

Para determinar si el transporte nuclear de mRNAs está alterado durante la infección con ZIKV, la ubicación de mRNAs en las células Huh-7 infectadas con ZIKV o transfectadas con NS2B-NS3 de ZIKV se analizó usando oligodT acoplado a la sonda Cy5 en un ensayo de hibridación *in situ* (FISH) (**Figura 14**).

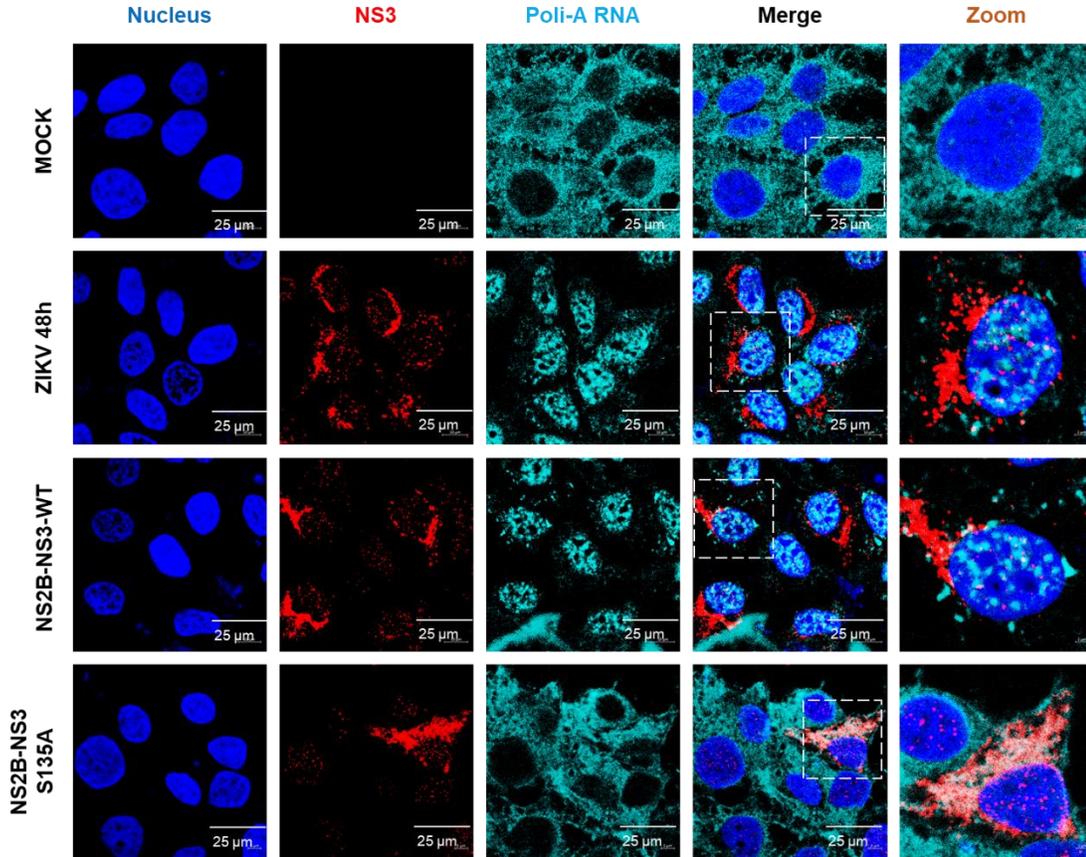


Figura 14. La proteasa NS2B-NS3 de ZIKV altera el exporte de mRNAs. Células Huh-7 se infectaron con ZIKV o se transfearon durante 48 horas con la proteasa NS2B-NS3 WT y la proteasa inactiva NS2B-NS3 S135A. La localización de los mRNAs con poli-A o NS3 de ZIKV se determinó usando oligo-dT acoplado a Cy5 y anti-NS3 respectivamente, usando microscopia confocal. Imágenes representativas de tres experimentos independientes

Como era de esperarse, en las células sin infectar, los mRNAs con cola de poli-A se localizan principalmente en citoplasma. Sin embargo, en las células infectadas con ZIKV se observa una reducción de estos mRNAs en citoplasma, y un aumento en su localización nuclear. Asimismo, al transfectar la proteasa NS2B-NS3 WT, pero no cuando transfectamos a la proteasa inactiva NS2B-NS3-S135A, la localización subcelular de los mRNAs se observa de manera similar a las células infectadas con ZIKV, lo que sugiere que, en ambos casos, los mRNAs no se exportan al citoplasma con la misma eficiencia que en células no infectadas (**Figura 14**).

Curiosamente, cuando se transfectó la proteasa inactiva NS2B-NS3 S135A, la cantidad de mRNAs en el citoplasma fue similar a la observada en las células sin infección. Estos resultados apoyan la idea de que la degradación de Nups por la infección o transfección de la proteasa NS2B-NS3 WT de ZIKV altera el tráfico núcleo-citoplasma de proteínas y mRNAs.

NS3 de ZIKV se localiza en el núcleo celular al inicio de la infección, y en el citoplasma en tiempos posteriores de la infección de las células Huh-7.

Los miembros del género *Flavivirus* tienen un ciclo replicativo citoplasmático, traduciendo y replicando su genoma en el ER (Brand et al., 2017b). Sin embargo, algunas de sus proteínas virales, como C, NS1 y NS5, contienen señales de localización nuclear (NLS) y se encuentran en el núcleo de las células infectadas (Hertzog et al., 2018; Hou et al., 2017; Wang et al., 2017). Nuestro grupo ha descrito que DENV NS3 se localiza en el núcleo de las células de mosquito C636 y, recientemente, describimos que DENV NS3 se localiza temprano en la infección en el núcleo de las células de hepatocarcinoma Huh-7 (Palacios-Rápalo et al., 2021; Reyes-Ruiz et al., 2018). Sin embargo, no se ha informado sobre la localización subcelular de la proteína NS3 de ZIKV.

Para estudiar la localización subcelular de NS3 de ZIKV, las células Huh-7 se infectaron con ZIKV a un MOI de 3 y se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta (IIF) y microscopía confocal a las 8, 12, 16 y 24 horas post-infección (hpi). Al igual que en la infección por DENV, la proteína NS3 de ZIKV se observó predominantemente en el núcleo y en menor medida en el citoplasma de las células Huh-7 a las 8 y 12 horas posteriores a la infección (HPI) (**Figura 15A**). No se observaron diferencias significativas en la cantidad de NS3 nuclear en estos dos tiempos posteriores a la infección (**Figura 15B**).

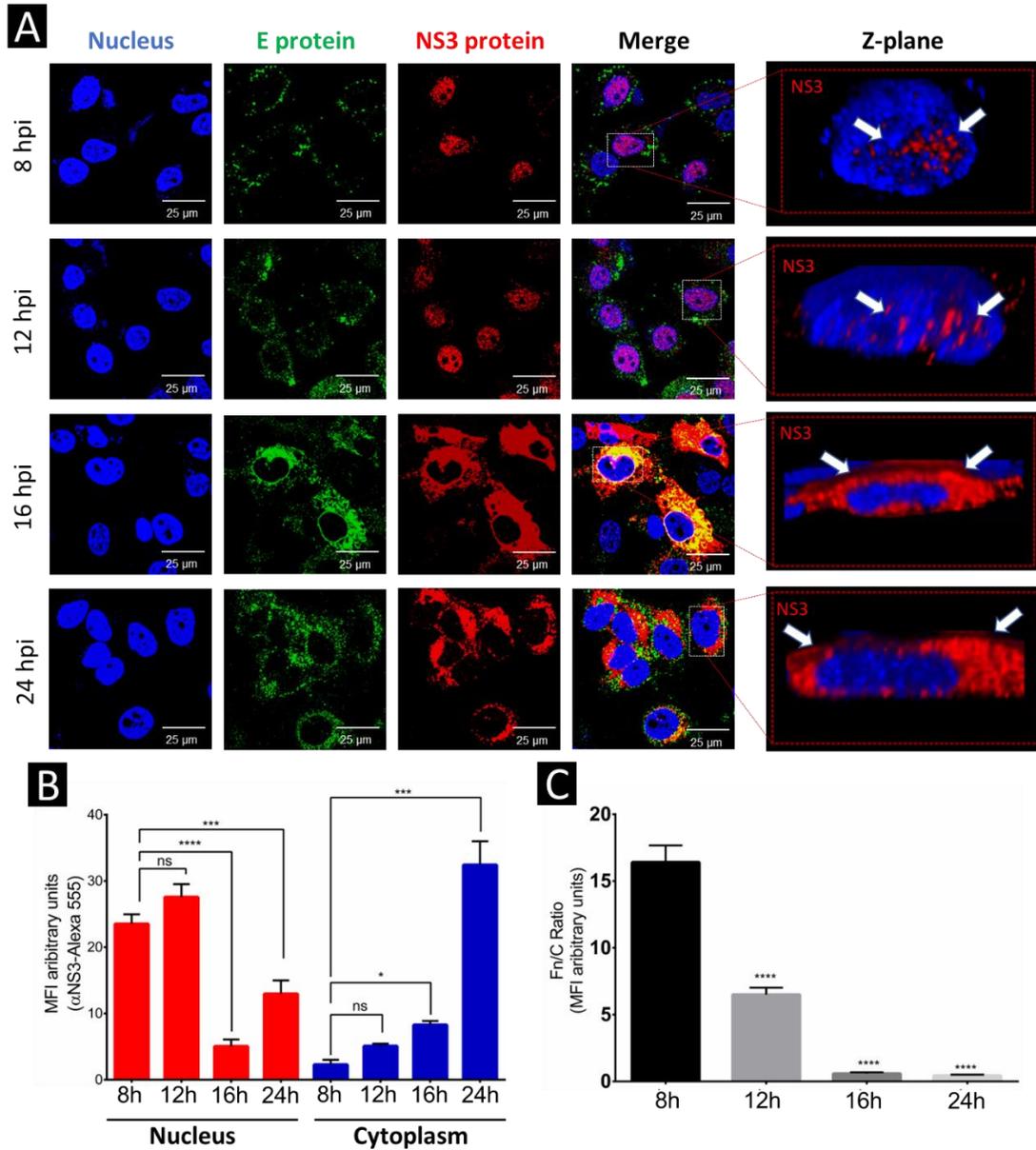


Figura 15. La proteína NS3 de ZIKV se localiza en el núcleo al inicio de la infección y en el citoplasma a momentos posteriores de la infección en las células Huh-7. (A) La ubicación de las proteínas NS3 y E en células Huh7 sin infección o células Huh7 infectadas con ZIKV a las 8, 12, 16 y 24 h después de la infección (hpi) se analizó mediante microscopía confocal usando anti-NS3 (rojo) y anticuerpos anti-E (verde) y tinción de Hoechst de núcleos (azul). Para determinar la localización nuclear de NS3 de ZIKV, se analizaron imágenes tridimensionales recortadas (imágenes YZ clip 3D), como se menciona en la metodología. (B) Se determinó el MFI para regiones seleccionadas de interés en el núcleo y el citoplasma (30 células por condición) y (C) Se determinó la relación Fn/Fc para estas regiones seleccionadas

de interés en cada imagen de microscopía confocal de inmunofluorescencia. *, $p = 0,05$; **, $p = 0,001$; ***, $p = 0,0001$; ****, $p < 0,0001$.

A las 16 y 24 horas posteriores a la infección, la localización de la proteína NS3 se encontró predominantemente en el citoplasma y en mucha menor medida en el núcleo (**Figura 15A y 1B**), lo que indica que en tiempos tardíos de la infección la proteína NS3 de ZIKV es predominantemente citoplasmática. Estos resultados fueron confirmados por la disminución en la relación de fluorescencia entre los niveles nucleares y citoplasmáticos de NS3 (**Figura 15C**).

Para demostrar la localización subcelular de la proteína NS3 a las 12 y 24 hpi, se realizaron ensayos de microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando anticuerpos anti-NS3 específicos. De acuerdo con los resultados mostrados en la **Figura 15**, la proteína NS3 se observó predominantemente nuclear (N) y en menor medida en el citoplasma (C) a las 12 hpi (**Figura 16B**). Sin embargo, a las 24hpi se observó principalmente en el citoplasma y en menor medida en los núcleos (N) (**Figura 16C**). En las células infectadas con ZIKV (**Figura 16 B y C**), encontramos algunas alteraciones en el RE, en comparación con las células no infectadas. (**Figura 16A**).

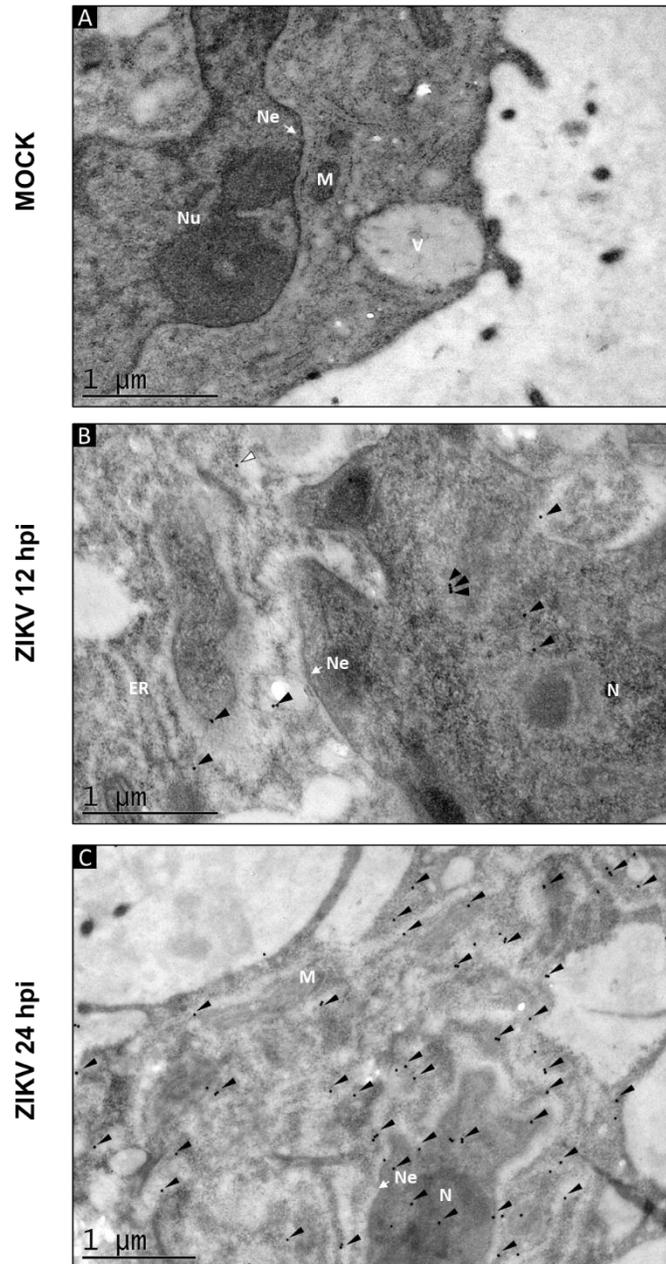


Figura 16. La proteína NS3 de ZIKV se encuentra en el núcleo de las células Huh7 durante la infección por ZIKV. (A) Células Huh7 sin infectar o (B) infectadas con ZIKV se fijaron y procesaron para TIM usando un anticuerpo anti-NS3 a las 12 hpi y (C) a las 24 hpi. La señal de etiquetado específica de NS3 se ve como puntos oscuros, indicados por una punta de flecha. Ne, envoltura nuclear; Nu, núcleo; RE, retículo endoplásmico; M, mitocondrias.

Ivermectina y leptomicina B inhiben el importe y exporte nuclear de la proteína NS3 de ZIKV en células Huh-7

Las proteínas C y NS5 del ZIKV utilizan las vías clásicas de importe nuclear (importina α/β) y exporte (CRM-1) para ser importadas y exportadas del núcleo. La ivermectina (IVM) es un fármaco específico que se utiliza para inhibir la vía clásica de importe (importina α/β) y se ha utilizado ampliamente para determinar qué proteínas utilizan esta vía para internalizarse en el núcleo. Por otro lado, la leptomicina (LMB) es un inhibidor específico de la vía clásica de exporte nuclear (CRM-1), que se utiliza para determinar la salida del núcleo de C, NS5 y otras proteínas virales y celulares (Fraser et al., 2014; Rawlinson et al., 2009; Wagstaff et al., 2012).

Para analizar la participación de las rutas clásicas de importe y exporte en el transporte núcleo-citoplásmico de la proteína NS3 en células infectadas, se utilizaron IVM y LMB. El primer paso fue determinar la viabilidad celular de las células Huh-7 en presencia de ambos fármacos a las concentraciones utilizadas anteriormente para analizar el importe y exporte de la proteína NS5 de ZIKV (Fraser et al., 2014). Se probaron IVM a concentraciones de 12, 25, 50, 75 y 100 μM y LMB a concentraciones de 5, 10, 15 ng/ml. En ambos casos, no se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular con las diferentes concentraciones de los fármacos probados con respecto a las células tratadas con los vehículos (DMSO y etanol) (**Figura 17**).

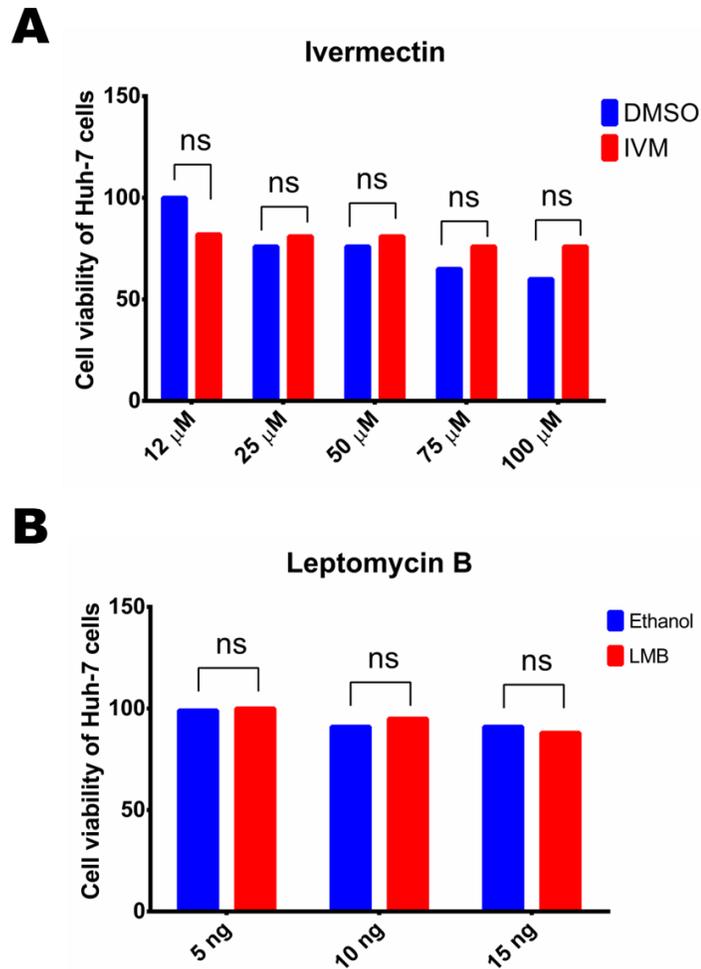


Figura 17. Ensayo de viabilidad celular por MTT con diferentes concentraciones de Ivermectina o Leptomicina B. Los gráficos representan los porcentajes de la viabilidad celular de células tratadas con (A) Ivermectina o (B) Leptomicina y con el vehículo DMSO o Etanol. Los porcentajes se obtuvieron tomando como 100% la viabilidad celular del control de células sin fármaco.

Una vez analizada la viabilidad celular, se analizó la localización subcelular de NS3 de ZIKV en presencia de ambos fármacos. Dado que nuestros experimentos anteriores indicaron que a las 12 hpi, la proteína NS3 está principalmente en el núcleo de las células infectadas, si esta proteína usa la vía de importina α/β para internalizarse en el núcleo, la inhibición parcial de

esta vía con IVM evitaría su presencia en el núcleo y debería observarse en el citoplasma a las 12 hpi (**Figura 18A**).

Células Huh-7 se infectaron con ZIKV a una MOI de 3 durante 2 h, después se eliminó el virus y se agregó medio de cultivo con IVM a la concentración de 12.5 μM . Como control del bloqueo en el importe por IVM se transfectaron células Huh-7 con el plásmido que expresa al antígeno T SV40 acoplado a la tetra-GFP en presencia de 12.5 μM de IVM 1. La localización celular de la proteína NS3 del ZIKV se analizó a las 12 hpi mediante microscopía confocal utilizando un anticuerpo anti-NS3. Como control del efecto de IVM en la vía de importe, se utilizó un anticuerpo anti-Imp α .

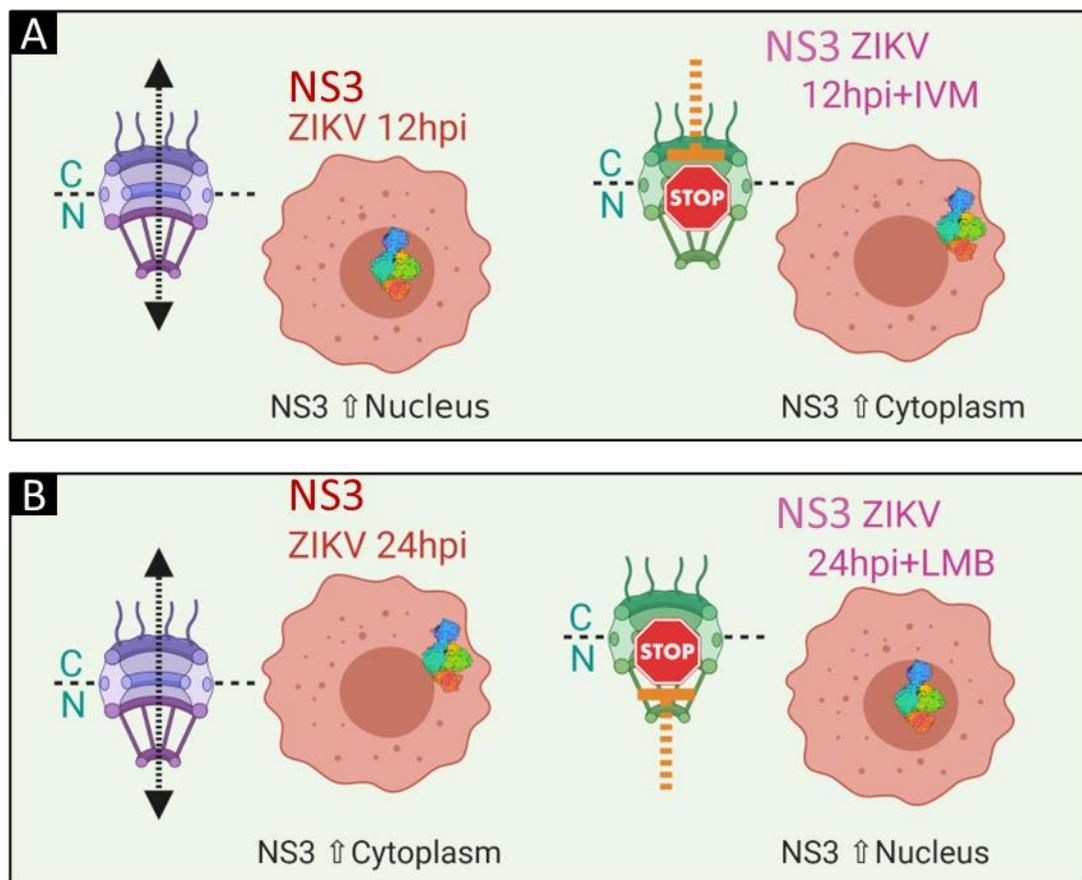


Figura 18. Esquemización de la hipótesis de localización de la proteína NS3 de ZIKV durante la inhibición de las vías de la importina α y la exportina CRM-1, utilizando IVM

y **LMB, respectivamente.** (A) Se muestra la localización de NS3 a las 12 hpi y su localización durante la inhibición de la importina α con IVM. (B) Se muestra la localización de NS3 a las 24 hpi y su localización durante la inhibición de la exportación de CRM-1 con LMB.

Las células sin infección (Mock) tratadas con IVM mostraron que la localización subcelular del NLS-SV40 es citoplasmática y nuclear, en comparación con las células sin tratamiento que mostraron localización subcelular del NLS-SV40 en el núcleo, lo que indica la inhibición de esta vía por acción de la IVM. La localización subcelular de la proteína NS3 también se observó afectada por la presencia de IVM, ya que se localizó principalmente en el citoplasma, a diferencia de las células infectadas no tratadas, donde se observa en los núcleos (**Figura 19 A-B**). Estos resultados demuestran que el tratamiento con IVM previene el importe de la proteína NS3 al núcleo al inhibir la vía de Imp α/β . Estos resultados también fueron confirmados por la disminución en la relación Fn/C de NS3 en células tratadas con IVM y no tratadas (**Figura 19C**).

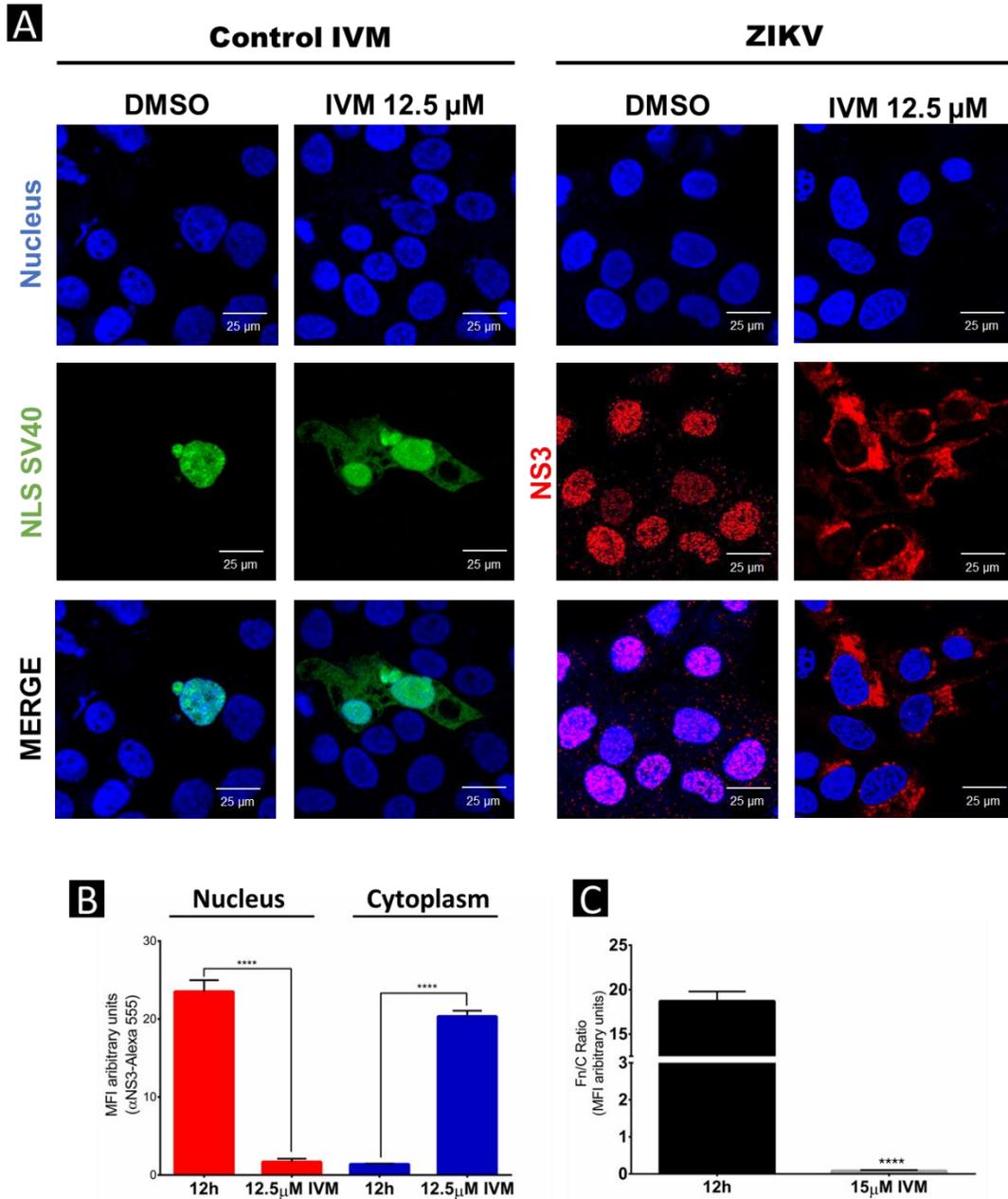


Figura 19. La ivermectina inhibe el importe nuclear de la proteína NS3 de ZIKV en células Huh-7. (A) La ubicación de las proteínas NS3 e NLS-SV40-GFP en células Huh7 no tratadas o tratadas con IVM, se analizaron mediante microscopía confocal usando anti-NS3 (rojo) y tinción de Hoechst de núcleos (azul). Para determinar la localización nuclear de NS3 de ZIKV, se analizaron imágenes de cortes tridimensionales (imágenes YZ clip 3D), como se menciona en la metodología. (B) Se determinó el MFI para regiones seleccionadas de interés en el núcleo y el citoplasma (30 células por condición) y (C) Se determinó la relación Fn/Fc para estas regiones seleccionadas de interés en cada imagen de microscopía confocal de

inmunofluorescencia en las diferentes condiciones. *, $p = 0,05$; **, $p = 0,001$; ***, $p = 0,0001$; ****, $p < 0,0001$.

Dado que nuestros experimentos anteriores indican que a las 24 hpi la proteína NS3 se localiza principalmente en el citoplasma de las células infectadas, quisimos analizar si esta proteína es exportada por la vía CRM1, (**Figura 18B**). Las células Huh-7 se infectaron con ZIKV a una MOI de 3 durante 2 h, el virus se eliminó y se agregó medio fresco con LMB a la concentración de 15 ng/ml (Rawlinson et al., 2009). La localización subcelular de ZIKV NS3 se analizó a las 24 hpi mediante IIF utilizando un anticuerpo anti-NS3. Como control de la actividad de LMB en la vía de exporte, se utilizó un anticuerpo anti-CCNB1, la cual usa la vía CRM-1 para su exporte.

En las células sin infección ni tratamiento, CCNB1 se encuentra en el citoplasma y el área perinuclear, mientras que, en las células sin infección, pero tratadas con LMB, CCNB1 se observa principalmente en el núcleo (**Figura 20A**), lo que sugiere una inhibición parcial de la vía. Por otro lado, mientras que en células infectadas por ZIKV durante 24 h la localización subcelular de la proteína NS3 es en el citoplasma, en concentraciones crecientes de LMB la proteína NS3 fue retenida en el núcleo, lo que indica que utiliza la vía de exporte nuclear dependiente de CRM-1 (**Figura 20 A y B**).

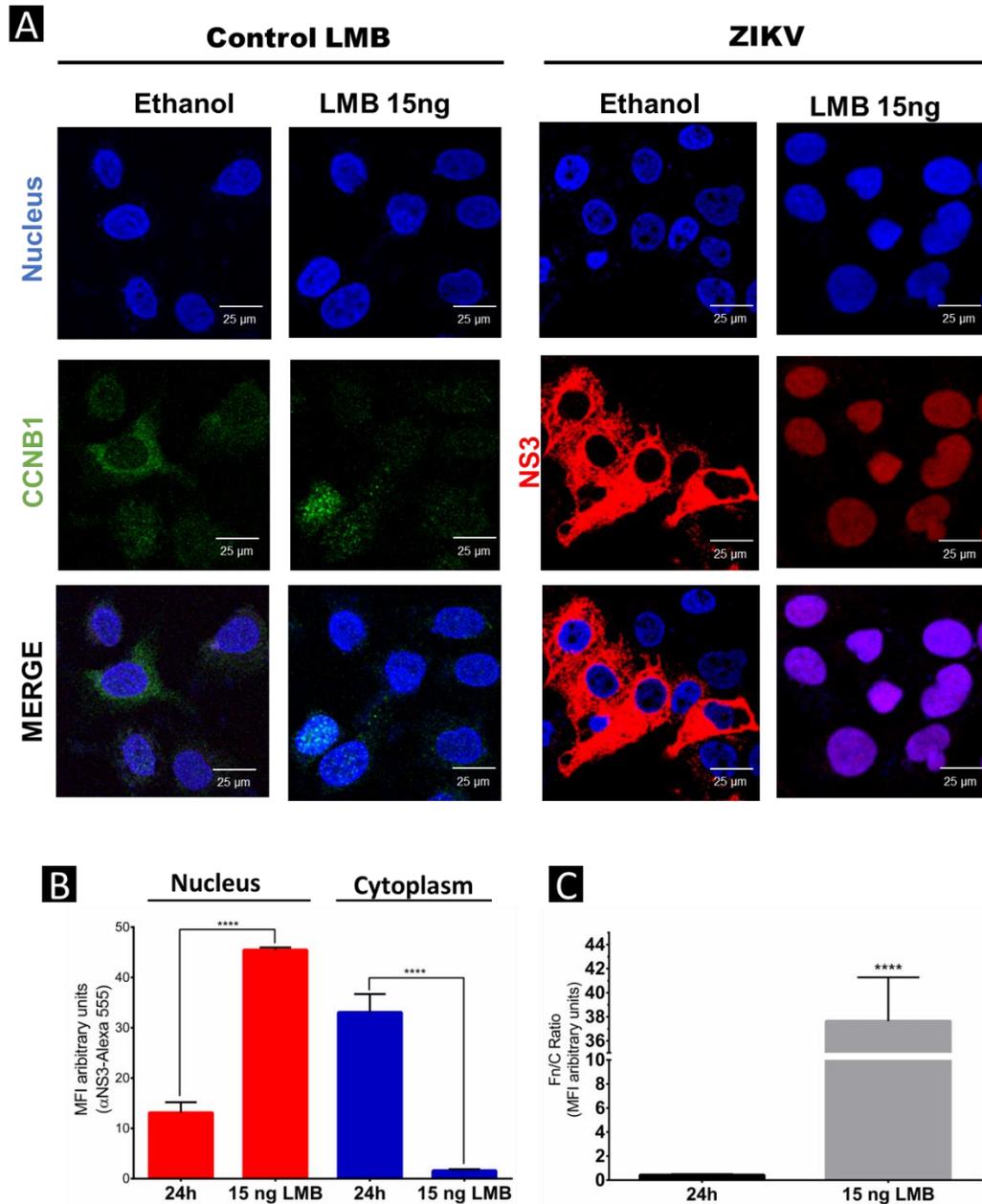


Figura 20. La leptomicina B inhibe el transporte nuclear de NS3 de ZIKV en células Huh-7.

(A) La ubicación de las proteínas NS3 y CCNB1 en células Huh7 tratadas con LMB sin infección o células Huh7 infectadas con ZIKV (24hpi) con diferentes concentraciones de LMB se analizaron mediante microscopía confocal usando anti-NS3 (rojo) y anticuerpos anti-CCNB1 (verde) y tinción de Hoechst de núcleos (azul). Para determinar la localización nuclear de NS3 de ZIKV, se analizaron imágenes de cortes tridimensionales (imágenes YZ clip 3D), como se menciona en la metodología. (B) Se determinó el MFI para regiones seleccionadas de interés en el núcleo y el citoplasma (30 células por condición) y (C) Se determinó la relación Fn/Fc para estas regiones seleccionadas de interés en cada imagen de microscopía confocal

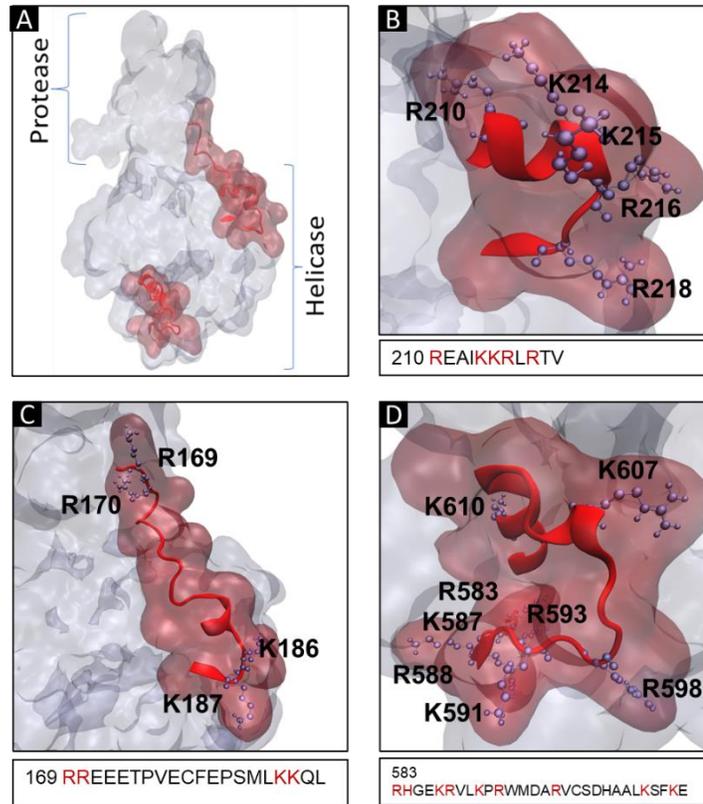
de inmunofluorescencia en las diferentes condiciones. *, p = 0,05; **, p = 0,001; ***, p = 0,0001; ****, p < 0,0001.

Este resultado se confirmó en el análisis MFI de la proteína NS3, en donde se cuantificó el aumento de la localización nuclear y se obtuvieron diferencias significativas entre las células tratadas con LMB frente a las células sin tratamiento (**Figura 20B**), demostrando que el tratamiento con LMB provoca la retención de la proteína la proteína NS3 del ZIKV en el núcleo. Esto también fue confirmado por el aumento en la relación Fn/C de NS3 en células tratadas con LMB y sin tratar (**Figura 20C**).

Predicción *in silico* de señales de localización nuclear (NLS) y señales de exporte nuclear (NES) en la proteína NS3 de ZIKV.

El transporte dirigido por la Importina α/β requiere secuencias específicas que se reconocen en las proteínas de carga que cruzan la membrana nuclear desde el citoplasma. Estas NLS contienen aminoácidos repetidos de arginina (Arg o R) y lisina (Lys o K). La NLS clásica (descrita en el antígeno T grande del virus SV40) consta de cinco aminoácidos KKKRK. Además, algunas proteínas poseen NLS bipartita compuesto por dos grupos de aminoácidos básicos, separados por aproximadamente diez aminoácidos (Christie et al., 2016; Kosugi, Hasebe, Matsumura, et al., 2009).

El análisis *in silico* con predictores de NLS como cNLS Mapper, Wregex y Prosite (Kosugi, Hasebe, Tomita, et al., 2009; Prieto et al., 2014; Sigrist et al., 2013) nos permitió identificar una NLS putativa tipo monopartita (210 REAIKKRLRTV) y tres tipo bipartitas putativas de NLS (169 RREEETPVECFEPSMLKKQL, 202 RRVLPEIVREAIKKRLR y 583 RHGEKRVLPKPRWMDARVCSHAALKSFKE), en la proteína NS3 de ZIKV. Curiosamente, la NLS 210 monopartita está contenida en el NLS 202 bipartito. Por lo tanto, esta secuencia podría funcionar como una NLS monopartita o bipartita (**Figura 21 A-D**).



E	169 KREEETPVEC FEP SMLKKQL	202 210 RRVLP EIV/REA IKKRLR	583 KHGEKRV LKPRWMDARVCS DHAALKSFKE
ZIKV (strain Mr766)	KREEETPVEC---FEP SMLKKQL	RRVLP EIVREA IKKRLR	KYGEKRV LKPRWMDARVCS DHAALKSFKE
LANTV (strain TP21)	EVEKSRPNLPQSVVGTGWTA KGQI	HRVLP EIVRQCVERRLR	PNGAERTLRPVWRDARMFREGRDIREFVS
YFV (isolate Ivory Coast/1999)	EVKEEGKEEL--QEIPTMLKKGMT	RRFLPQILAECARRRLR	PGGAKKPLRPRWCDERVSSDQSALADFIK
DENV4 (strain H241 Filipinas)	ERTGE-PDYE---VDEDIFRKKRL	KRILP SIVREALKRRLR	REGK KKL RPKNLDARVYADPMLKDFKE
DENV2 (strain New Guinea)	EKSIE-DNPE---IEDDIFRKKRL	KRYLPAIVREA IKRGLR	KEGERKKL KPRWLDARIYSDPLALKEFKE
DENV1 (strain Brazil/97-11/1997)	KASQEGPLPE---IEDEVFKKRNL	RRYLP AIVREA IKRRLR	KEGERKKL RPRWLDARTYSDPLALREFKE
DENV3 (strain Sri Lanka/1266/2000)	NAEPDGP TPE---LEEEMFKKRNL	RKYLPAIVREA IKRRLR	KEGEK KKL RPRWLDARTYSDPLALKEFKD
WNV (strain NY-99)	ERMDEPI PAG---FEPEMLRKKQI	RRILPQIIKEA INRRLR	KLGERKIL RPRWLDARVYSDHQA LKAFKD
JEV (strain SA-14)	DRQE E PVEA---YTPNMLRKRQM	RKILPQIIKDAIQQLR	RMGERKIL RPRWLDARVYADHQA LKWFKD
 *	:: * * :: : . : * *	* . : * * * * : * *
Sequence identity	9.52-47.62 %	41.18-76.47 %	27.59-89.66 %

Figura 21. Predicción *in silico* de señales de localización nuclear (NLS) en la proteína NS3 de ZIKV. (A) Estructura tridimensional de NS3 que muestra la ubicación de los supuestos NLSs, identificado con el software cNLS Mapper y WREGEX. (B) Estructura y secuencia del NLS-210 putativo. (C) NLS-169 putativo. (D) NLS-583 putativo. (E) Alineación de NLS putativos de diferentes miembros de *Flavivirus*, utilizando ClustalW.

La localización nuclear de la proteína NS3 se ha descrito en otros miembros de la familia *Flaviviridae*, como el HCV, (Wölk et al., 2000; Zhou et al., 2017), JEVWNV (Uchil et al., 2006) y DENV (Palacios-Rápalo et al., 2021; Reyes-Ruiz et al., 2018). Así se analizó el grado de conservación de estas secuencias en diferentes miembros del género *Flavivirus*. El alineamiento de secuencias

realizado con ClustalW2 (Madeira et al., 2019), reveló una alta conservación entre los miembros del género *Flavivirus*: la NLS monopartita/bipartita (202/210) con una identidad de 41,18-76,47 % y la NLS bipartita 583 con una identidad de 27,59-89,66 % (**Figura 21 E**).

Por otro lado, las NES están compuestas por secuencias ricas en leucina o aminoácidos hidrófobos como la valina (Val o V), isoleucina (Ile o I), fenilalanina (Phe o F) o metionina (Met o M) (Hutten & Kehlenbach, 2007b; la Cour et al., 2003; Xu et al., 2010b).

Para identificar *in silico* estas secuencias en la proteína NS3 de ZIKV se utilizaron los predictores NES LocNES y NetNES (la Cour et al., 2004; Xu et al., 2015). Se identificaron dos NES probables (85 LDAAWDGLSEVQLLAVPPGE y 248 TRVVAAEMEEALRGL) (**Figura 22 A-C**). El grado de conservación de estas secuencias en los diferentes miembros del género *Flavivirus* encontró a NES 248 con la mayor identidad de secuencia (66,67-93,33%) entre los demás flavivirus analizados (**Figura 22 D**).

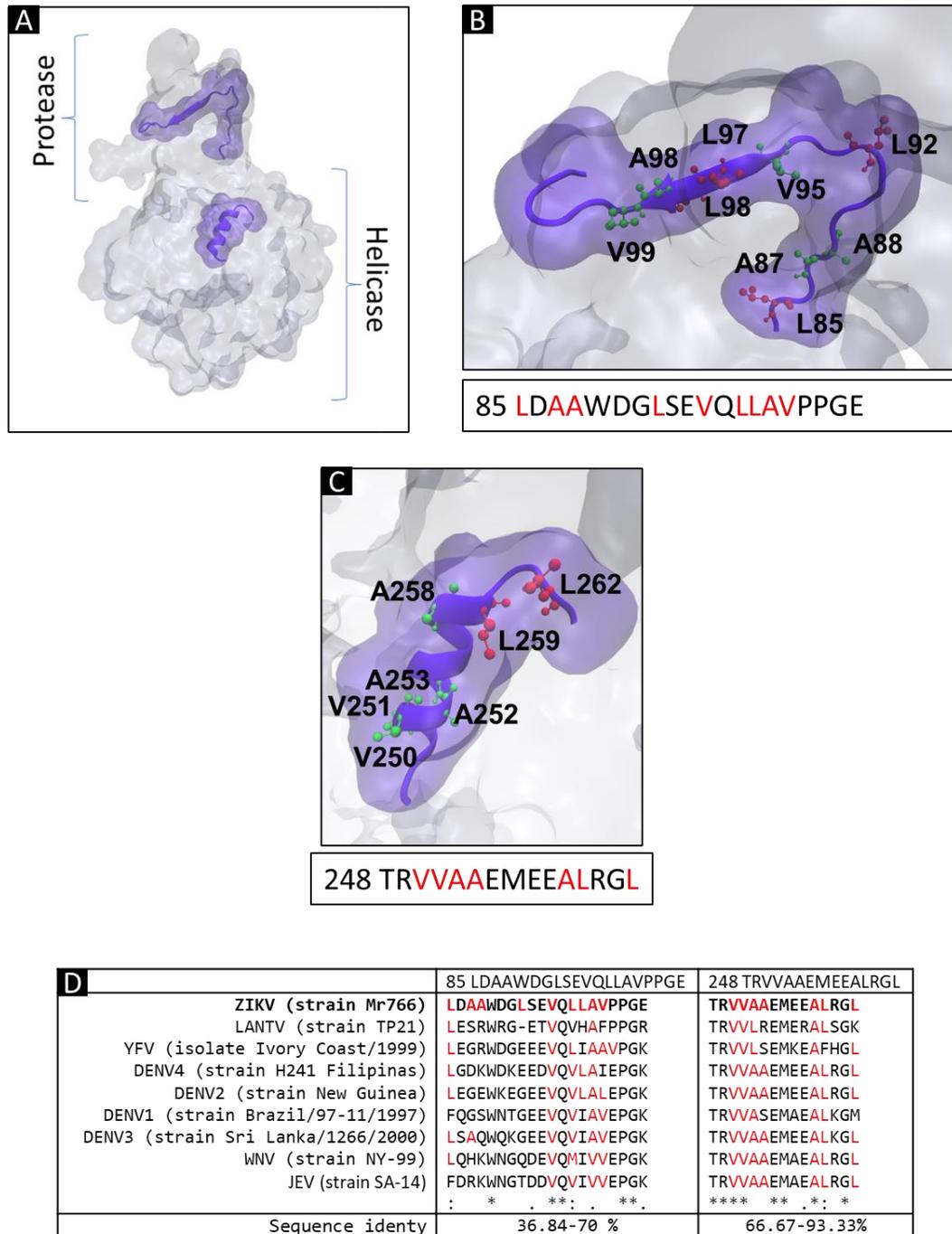


Figura 22. Predicción *in silico* de señales de exporte nuclear (NES) en la proteína NS3 de ZIKV. (A) Estructura tridimensional de la proteína NS3 que muestra la ubicación de la NESs putativas, identificadas con el software LocNES y WREGEX. (B) Estructura y secuencia de la NES-85 putativo. (C) NES-248 putativa. (D) Alineación de NESs putativas de diferentes miembros del género Flavivirus, utilizando ClustalW.

Una mutación en la NLS-210 putativa de la proteína NS3 de ZIKV impide su localización nuclear.

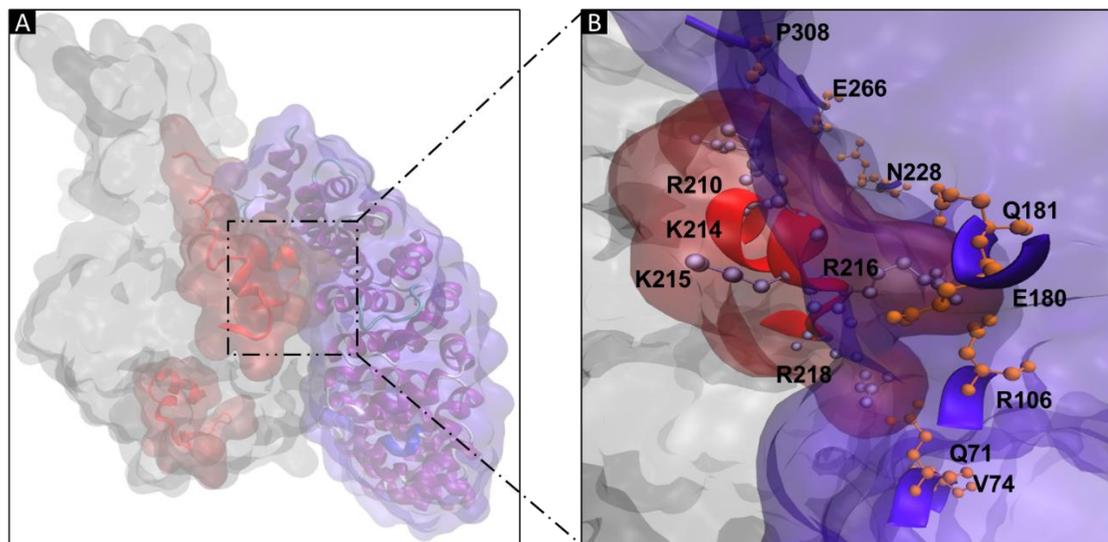
Una vez que se identificaron *in silico* una NLS tipo monopartita (210 REAIKKRLRTV) y tres bipartitas putativas (169 RREEETPVECFEPSMLKKQL, 202 RRVLP EIVREAIKKRLR y 583 RHGEKRV LKPRWMDARVCS DHAALKSFKE), determinamos cuál de estas secuencias pudieran ser las responsables del importe nuclear de la proteína NS3 de ZIKV a través de la vía de Imp α/β . Para ello, se realizó un ensayo de acoplamiento molecular utilizando a las proteínas Importina α y NS3 de ZIKV.

Como primer paso, se llevó a cabo el modelado estructural de la proteína NS3 de ZIKV ya que la región de proteasa/helicasa no se ha reportado en las bases de datos como el Protein Data Bank. Los servidores de modelado de homología estructural I-TASSER, RaptorX y Swiss-Model se utilizaron para modelar la proteína NS3 del ZIKV, tomando a la proteína NS3 de DENV-4 (PDB ID: 2WHX) como plantilla (Luo et al., 2010). Las diferentes estructuras modeladas de la proteína NS3 se evaluaron mediante el gráfico de Ramachandran utilizando el servidor SAVES v6.0 (Agnihotry et al., 2022). Según el porcentaje de residuos en las áreas permitidas del gráfico, elegimos el mejor modelo para la prueba de Molecular Docking. El modelo con mayor porcentaje (92%) de residuos en las áreas permitidas de la parcela Ramachandran se obtuvo con Swiss-Model. Este modelo se utilizó en la prueba de acoplamiento molecular.

Para la prueba de acoplamiento molecular, utilizamos el servidor HDOCK (Yan et al., 2020). La capacidad del servidor para predecir la unión entre diferentes NLS e Importina α reportados en la literatura, como la NLS de NS5 de ZIKV (RKRPRV), de SV40 large T-antigen (PKKKRKV) y de HAT-KAT8 (RNQKRKHDEI) fue evaluada. Encontramos que el Docking Score (DS) osciló entre -199,21 y -215,02 kcal/mol-1, entre las diferentes NLS e Imp α .

Para determinar la NLS putativa responsable del importe nuclear de la proteína NS3 de ZIKV por la vía Imp α/β , se realizó el ensayo de acoplamiento

molecular utilizando Imp α (PDB ID: 5W41) y NS3 de ZIKV, previamente modelados. La importina α está compuesta por dos dominios, un dominio N-terminal auto-inhibitorio, llamado dominio de unión a importina- β (IBB), y un dominio Arm C-terminal (armadillo), que reconoce y se une a NLS de proteínas de carga (Pumroy & Cingolani, 2015). Encontramos que la proteína NS3 de ZIKV se une a la región armadillo de Importina α con un DS de -213.21 kcal/mol-1, energía de unión similar a los controles anteriores (**Figura 23A-B**).



Putative NLS of NS3 ZIKV	Imp α residue	Binding free energy (kcal/mol-1)
210 R	223 C	-0.14
211 E		
212 A	124 F	-0.13
213 I	177 H	-1.63
214 K	99 A, 177H	-7.2
215 K	181 Q, 228 N	-5.7
216 R	180 E, 184 W, 142 W, 181 Q, 228 N	-12.09
217 L	180 E, 106 R	-6.5
218 R	71 Q, 74 V	-3.5

Figura 23. Acoplamiento molecular de NS3 de ZIKV-Importin α . (A) Acoplamiento molecular de NS3 de ZIKV-Importina α . (B) Unión de los dominios armadillo de Importina α y el NLS-210 putativo de la proteína NS3 de ZIKV. El análisis de acoplamiento molecular se

realizó utilizando el software HDOCK, la estructura de proteína 3D de la Importina α utilizada fue PDB ID: 4WV6. (C) Análisis MM/GBSA de la unión de los dominios armadillo de Importina α y el NLS-210 putativo de la proteína NS3 de ZIKV, prediciendo la energía libre de unión del complejo proteína-proteína para cada residuo. Fue hecho con el software HawkDock.

A continuación, realizamos un análisis MM/GBSA con el servidor HawkDock (Weng et al., 2019), que predice la energía libre de unión de un complejo proteína-proteína para cada residuo. Encontramos una energía de unión más alta en los residuos 210-218 (REAIKKRLR) de la proteína NS3 de ZIKV (**Figura 23C**), una región predicha previamente como un supuesto NLS (NLS-210). Curiosamente, los residuos 214K, 215K y 216R proporcionaron la energía más alta entre las proteínas NS3 e Importina α .

Para determinar el papel de los nucleótidos KKR en el importe de la proteína NS3 del ZIKV, se realizó una mutagénesis dirigida hacia estos residuos en el plásmido NS2B3-210NLS (amablemente donado por el Dr. Jonathan Ball, Universidad de Nottingham, Reino Unido) que contiene la secuencia de NS2B3 de ZIKV utilizando el Q5 Kit de mutagénesis sitio dirigida (NEB). Los residuos 214K, 215K y 216R, que son los que proporcionaron mayor energía de unión entre NS3 e Importina α , se cambiaron a 214A, 215A y 216A y se obtuvo el plásmido NS2B3-210NLS-Mut. Los oligonucleótidos que contenían la mutación REAI**AA**LR se diseñaron siguiendo las instrucciones del fabricante (**Ver en Métodos**).

Las células Huh-7 se transfectaron de forma independiente con los plásmidos NS2B3-WT y NS2B3-210NLS-Mut, y la ubicación subcelular de la proteína NS3 de ZIKV se analizó 48 h después de la transfección mediante microscopía confocal. NS2B3-WT se encontró localizada principalmente en el citoplasma y en menor extensión en el núcleo de las células transfectadas, mientras que NS2B3-210NLS-Mut se observó solo en el citoplasma y en mayor extensión en comparación con NS2B3-WT (**Figura 24 A-B**). La relación Fn/C indicó una cantidad mayor de NS3 nuclear en las células transfectadas con NS2B3-WT

que en las células transfectadas con NS2B3-210NLS-Mut (**Figura 24C**), lo que sugiere que la región 210NLS es responsable de la localización nuclear de NS3.

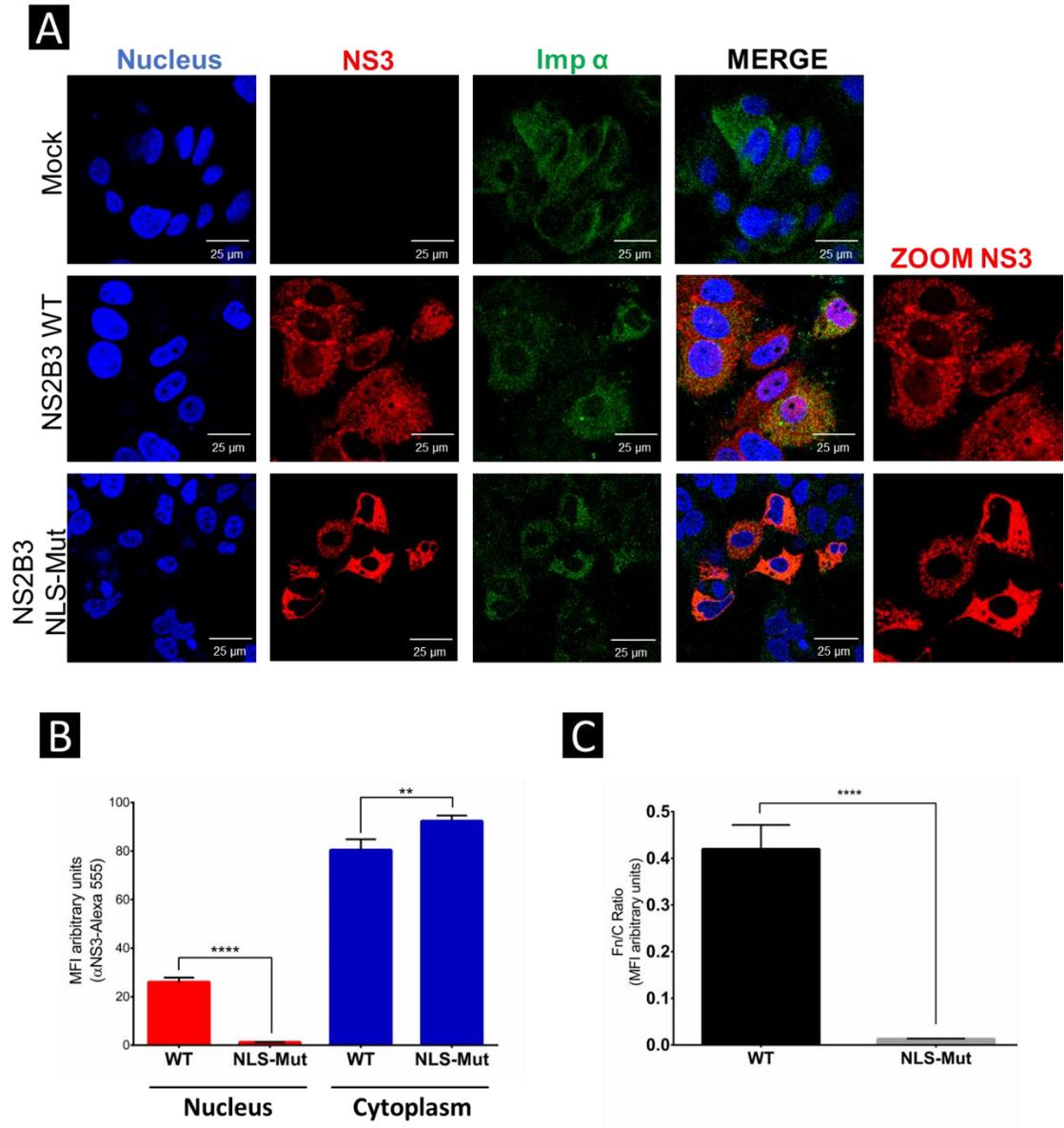


Figura 24. La mutación en la NLS-210 putativa de la proteína NS3 de ZIKV impide su localización nuclear. (A) La ubicación de las proteínas NS2B3 WT o NLS-210 e Importina α mutadas en células Huh7 se analizaron 48 h después de la transfección mediante microscopía confocal usando anticuerpos anti-NS3 (rojo) y anti-importina α (verde) y tinción para Hoechst de núcleos (azul). Para determinar la localización nuclear de la proteína NS3 de ZIKV, se analizaron imágenes de cortes tridimensionales (imágenes YZ clip 3D), como se menciona en

la metodología. (B) Se determinó el MFI para regiones seleccionadas de interés en el núcleo y el citoplasma (30 células por condición), y (C) Determinamos la relación Fn/Fc para estas regiones de interés en cada imagen de microscopía confocal de inmunofluorescencia. *, $p = 0,05$; **, $p = 0,001$; ***, $p = 0,0001$; ****, $p < 0,0001$.

Discusión

Durante el ciclo de replicación citoplásmico de los flavivirus, algunas proteínas virales se trasladan al núcleo. Específicamente, la proteína C que participa en el ensamblaje y la encapsidación viral y la NS5 que es una RNA polimerasa dependiente de RNA con actividad de metiltransferasa (Johansson et al., 2001; Reyes-Ruiz et al., 2018, p.). Además, también se ha observado que varias proteínas nucleares se trasladan del núcleo al citoplasma durante las infecciones con flavivirus. Mientras que algunas de las proteínas nucleares que se trasladan al citoplasma se degradan (como DDX21 y DDX56), La, PTB y algunas otras son necesarias para una replicación viral eficiente o para inhibir la respuesta inmune innata (Agis-Juárez et al., 2009; Dong et al., 2016; Yocupicio-Monroy et al., 2007).

Teniendo en cuenta que los virus pueden secuestrar componentes importantes de la célula huésped, analizamos posibles alteraciones en la estructura de, la envoltura nuclear y el NPC, el principal regulador del transporte nuclear-citoplasmático.

Reportes previos han descrito afectaciones en la morfología del núcleo y envoltura nuclear durante la infección por ZIKV y DENV. Estos estudios describieron la formación de sitios de extrusión en el núcleo que pueden afectar la función del centrosoma y la lámina nuclear durante la infección por ZIKV (Hou et al., 2017). Por otro lado, se ha observado la formación de estructuras similares a hebras en los núcleos de las células de los mosquitos durante la infección por DENV (Reyes-Ruiz et al., 2018). Por lo tanto, es posible que otros componentes de la envoltura nuclear (NE) también se alteren durante la infección. Así, analizamos la envoltura nuclear durante la infección

por ZIKV mediante microscopía electrónica de transmisión. El examen ultraestructural de las células infectadas por ZIKV mostró cambios en la morfología nuclear donde la Ne está distendida y tiene una marcada ausencia de electrodensidad en contraste con la de las células sin infección (**Figura 6**).

Las anomalías en la envoltura nuclear durante enfermedades degenerativas, cáncer, laminopatías e infecciones virales generan estrés celular como la erosión, en la que los componentes de NPC están desregulados. Además de la ruptura de Ne, estas anomalías afectan el transporte bidireccional entre el núcleo y el citoplasma a través del NPC (Alonso-Rangel et al., 2017; D'Angelo et al., 2009; Robijns et al., 2018; Vargas et al., 2012).

El NPC está constituido por múltiples copias de proteínas denominadas nucleoporinas, que conforman los filamentos citoplasmáticos, el anillo citoplasmático, el anillo interno del poro, el anillo nuclear y la canastilla nuclear (Beck & Hurt, 2017; Hezwani & Fahrenkrog, 2017). Dentro del canal central existen Nups con repetidos de Phe y Gly denominadas FG-Nups, que facilitan el transporte nuclear en ambos sentidos, ya que se unen a NTRs, algunas de estas son la Nup62, Nup58, Nup54, Nup98, Nup45, Nup214, hCG1, Nup153 y Nup50 (C. Li et al., 2016; Rothballer & Kutay, 2012).

Se han descrito que en otras infecciones virales son capaces de alterar la integridad del NPC y específicamente de algunas nucleoporinas como TPR, Nup153, Nup98 y Nup62. Esta alteración se realiza mediante proteasas virales como en las infecciones por Poliovirus y Rinovirus, o mediante otros mecanismos (Faria et al., 2005; Gustin y Sarnow, 2002; Huang et al., 2015; Malik et al., 2012; Park et al., 2008; Watters y Palmenberg, 2011).

En primer lugar, en este trabajo se analizaron TPR, Nup153, Nup98 y Nup62 durante la infección por ZIKV. El análisis de Western Blot de TPR, Nup153 y Nup98 durante la infección por ZIKV (12, 24 y 48 hpi) mostró una reducción en la cantidad de estas nucleoporinas a medida que avanzaba la infección, Mientras que no se observaron cambios en Nup62. Estos resultados muestran

que durante la infección por ZIKV se produce una pérdida de Nup98, Nup153 y TPR, pero no de Nup62 (**Figura 7**).

En segundo lugar, la transfección de la proteasa NS2B3 WT de ZIKV fue suficiente para inducir la reducción de los niveles de expresión de TPR, Nup153 y Nup98 por parte de sus respectivos anticuerpos en las células transfectadas mediante Western Blot. En tercer lugar, la proteasa WT pero no la mutante, pudo procesar Nups en las células transfectadas (**Figura 8**). De interés, se observó la ubicación de la proteasa viral tanto en los núcleos como en la región perinuclear, en donde se encuentran los complejos replicativos. Se ha descrito la degradación de las nucleoporinas por la actividad de las proteasas virales ubicadas tanto en el núcleo como en la región perinuclear, como las proteasas 3CD y 2A de Polio virus (Walker et al., 2013), lo que sugiere que la proteína NS3 podría ubicarse en la región perinuclear o dentro del núcleo para alcanzar y procesar sus Nups objetivo. El hecho de que la proteasa WT recombinante de ZIKV, pero no la mutante tuviera la capacidad de degradar varios de estas Nups indica fuertemente que la proteasa viral NS3 actúa de manera directa o indirecta sobre las Nups.

Este es el primer informe que muestra evidencia del efecto de la infección por flavivirus en esta importante estructura nuclear. Algunos otros virus citoplasmáticos utilizan el NPC como un atractivo objetivo anti-huésped. Los picornavirus son particularmente expertos en perturbar al NPC; por ejemplo, la proteína líder amino-terminal (L) del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) induce la hiperfosforilación de Nup62, Nup153 y TPR, a través de una cascada de proteína quinasa activada por mitógenos y dependiente de Ran (Porter & Palmenberg, 2009), interrumpiendo su actividad, mientras que la proteasa viral 2Apro de PV y HRV escinde Nup62, Nup98 y Nup153 (De Jesús-González et al., 2021), interrumpiendo la actividad de NPC. Las Nups degradadas durante la infección por ZIKV juegan un papel importante en el transporte de mRNAs, así como en el transporte de proteínas.

Al igual que durante la infección con PV y HRV el procesamiento de Nups altera el transporte núcleo-citoplasmático de proteínas y mRNAs. Las rutas clásicas de importe/exporte nuclear se encuentran alteradas durante la infección con PV y HRV. Nosotros también encontramos alteraciones similares durante la infección con ZIKV, como es la deslocalización y disminución en la cantidad de importina α y exportina CRM-1 (**Figura 9 y 10**).

Por otro lado, las vías de transporte no clásicas, como la mediada por la transportina 1 que participa en el transporte bidireccional de proteínas que contienen la secuencia M9-NLS (también llamada PY-NLS), presente en proteínas como la ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1 (hnRNP A1), y algunas otras involucradas en la unión, transcripción o procesamiento del ARN (Twyffels et al., 2014). Cuando se analizó esta vía durante la infección por PV, Gustin y Sarnow determinaron que EGFP-NLS-M9 también se redistribuía del núcleo al citoplasma en las células infectadas.

Además, estos mismos autores utilizaron una batería de anticuerpos dirigidos contra proteínas que utilizan diferentes rutas de transporte para analizar su localización subcelular. La hnRNP A1 (vía de la transportina 1 (Twyffels et al., 2014)) la hnRNP K (transporte nuclear K (señal KNS) (Görlich & Kutay, 1999)) se reubicaron en el citoplasma durante infección por PV (Gustin & Sarnow, 2001b). Sin embargo, algunas vías no se vieron afectadas por la infección, como la vía Exportina CRM1 y la vía Transportina SR (demostrada por la ubicación celular de SC35). Demostrando que algunas vías de transporte se ven afectadas y otras permanecen funcionales durante la infección por PV.

Nosotros encontramos resultados similares al analizar las vías de transporte no clásicas, como es el caso de la deslocalización subcelular y reducción en la cantidad de proteínas reporteras que contienen NLS (hnRNP A1, hnRNP K, proteínas SR). En contraste con la infección con PV, durante la infección de ZIKV la vía de importina α , exportina CRM-1, Transportina 1 (**Figura 11**), Transportina KNS (**Figura 12**) y Transportina SR (**Figura 13**), se encuentran alteradas.

Además de estas vías alteradas, también se encontró que la vía de exporte nuclear de mRNAs se encuentra alterada, ya que estos se retienen en el núcleo celular. La inhibición de este exporte se ha descrito en células infectadas con DENV como consecuencia de la inhibición del splicing de pre-mRNA por la NS5 polimerasa (Maio et al., 2016). Sin embargo, aquí encontramos que durante la infección con ZIKV la proteasa activa NS2-NS3 es responsable de retener a los mRNAs en núcleo, como posible consecuencia del procesamiento de Nups (**Figura 14**).

Esta inhibición proporciona a los flavivirus una ventaja en la traducción de su propio genoma porque los ribosomas tendrían una mayor posibilidad de traducir el RNA viral.

Por otro lado, muchas vías de señalización terminan con la translocación de factores de transcripción al núcleo para inducir la expresión de genes antivirales; bajo condiciones de infección (Hurtado-Monzón et al., 2020). Sin embargo, como diferentes mecanismos de transporte núcleo-citoplasma están alterados durante la infección con ZIKV ya que estos factores de transcripción podrían no ser transportados al núcleo, evitando la activación de genes de respuesta inmune antiviral y los mRNAs de genes activados son retenidos en núcleo por la interrupción de su exporte. En conjunto estas alteraciones generan un estado proviral, que favorece la replicación viral.

Como se mencionó anteriormente, aunque la replicación de los flavivirus tiene lugar en el retículo endoplásmico, la migración de proteínas al núcleo es común e importante en el ciclo replicativo viral (Lopez-Denman & Mackenzie, 2017b; Neufeldt et al., 2018). Proteínas virales como la proteína de la cápside que participa en el ensamblaje y la encapsidación viral y NS5 que tienen actividades de metiltransferasa y RNA polimerasa dependientes de RNA, migran al núcleo durante la infección por flavivirus (Johansson et al., 2001; Reyes-Ruiz et al., 2018).

La función de la proteína de la cápside en el núcleo aún no se comprende por completo. Sin embargo, las mutaciones en su NLS reducen la producción viral.

Curiosamente, el importe de la proteína de la cápside al núcleo se realiza a través de la vía clásica, a través de la importina α/β . Además, esta proteína interactúa con la helicasa DAXX evitando la vía de apoptosis del ligando Fas (Bhuvanakantham et al., 2009; Mori et al., 2005; Netsawang et al., 2010). En el caso de la polimerasa NS5, esta tiene una NLS conservada entre los miembros de su familia que al mutarla se reduce la formación de viriones. Debido a su tamaño, NS5 requiere del importe activo vía importina α/β . Curiosamente, la inhibición de esta vía con ivermectina reduce la formación de viriones (Johansson et al., 2001; Pryor et al., 2007; Rawlinson et al., 2009), destacando la importancia del núcleo en la replicación de los flavivirus. Además, se ha demostrado que la inhibición de la exportación de CRM1 con leptomicina B provoca la acumulación de NS5 en el núcleo y un aumento en la replicación viral.

Teniendo en cuenta la participación de la proteína NS3 de ZIKV en la degradación de componentes del núcleo celular como son las Nups, decidimos analizar podía importarse al núcleo. Nuestros resultados indican que la proteína NS3, al inicio de la infección (8 y 12 hpi) se localiza en el núcleo de las células infectadas. Sin embargo, a las 16 y 24 hpi se localiza en el citoplasma (**Figura 15 y 16**). Anteriormente en el laboratorio describimos la presencia de la proteína NS3 de DENV en el núcleo de células de mosquito C6/36 (48 hpi) (Reyes-Ruiz et al., 2018), y en células humanas Huh-7 a las 8 y 12 hpi (Palacios-Rápalo et al., 2021), lo cual es consistente con los resultados descritos aquí.

Teniendo en cuenta la presencia de la proteína NS3 al inicio de la infección en el núcleo, analizamos si se importa al núcleo mediante la vía de importina α/β y si la vía de CRM-1 desempeña un papel en su exporte. La participación de ambas vías se analizó utilizando compuestos como IVM y LMB, inhibidores específicos de las vías importina α/β y CRM-1 respectivamente (**Figura 18**). Curiosamente, la inhibición de la vía de la importina α/β con IVM inhibió el importe nuclear de la proteína NS3 a las 12 hpi (**Figura 19**), y la inhibición de

la vía de la exportina CRM-1 con LMB inhibió su transporte del núcleo a las 24 hpi (**Figura 20**), lo que indica que la proteína NS3 del ZIKV utiliza estas vías clásicas para ser transportada entre el núcleo y el citoplasma. Además, ambas vías son utilizadas por otras proteínas virales del ZIKV, como la polimerasa NS5 y la de la cápside (Bhuvanakantham et al., 2009; Johansson et al., 2001; Mori et al., 2005; Netsawang et al., 2010; Reyes-Ruiz et al., 2018), lo que demuestra la importancia del tráfico nuclear-citoplasmático durante el establecimiento de la infección.

Es bien sabido que el importe a través de la ruta de la importina α/β requiere la presencia de una NLS en la proteína; por esta razón, se analizó la presencia de NLS putativos en la secuencia de aminoácidos de NS3 de ZIKV (Hou et al., 2017). Nuestros resultados indican la presencia de tres NLS (**Figura 21**) y dos NES putativas (**Figura 22**). Además, la alineación de secuencias de la proteína NS3 de diferentes flavivirus nos permitió determinar que estas secuencias se conservan (**Figura 21E y 22D**). Este hallazgo es compatible con la localización nuclear de la proteína NS3 de otros flavivirus como DENV, JEV, HCV y Langkat

Para respaldar aún más la relevancia de estas secuencias en la interacción con la importina α/β , se realizó un ensayo de acoplamiento molecular. Predijimos la unión de la proteína NS3 de ZIKV y los dominios armadillo de la importina α (KPNA2), que son responsables de reconocer la proteína cargo y su posterior importe al núcleo (Kosugi, Hasebe, Matsumura, et al., 2009). Curiosamente, una de las porciones de la proteína NS3 que se une a la importina α es la NLS 210 REAIKKRLRTV putativa (**Figura 23**), descrita previamente por otros autores (Hou et al., 2017).

Para analizar si la NLS-210 es responsable del importe nuclear de la proteína NS3, esta secuencia fue modificada por mutagénesis sitio dirigida. Específicamente, la secuencia de aminoácidos de KKR de NLS-210 se mutó por un triplete de alaninas (AAA). Esta mutación inhibió el importe nuclear de la proteína NS3, lo que indica que la NLS-210 es responsable de su importe nuclear (**Figura 24**).

Aunque nuestros resultados indican claramente que la proteína NS3 de ZIKV contiene NLS y NES involucrados en su importe y exporte nuclear durante la infección, no sabemos qué elementos podrían estar involucrados en la modificación de la ubicación durante el ciclo replicativo viral. Es posible que los cambios conformacionales de la proteína NS3, los niveles de fosforilación o su asociación con otras proteínas virales o celulares puedan determinar la ubicación de la proteína en momentos específicos de la infección viral. Por lo tanto, la localización nuclear o citoplasmática de la proteína NS3 requiere un análisis más profundo.

Además, nuestros resultados describen por primera vez que la infección con ZIKV induce la alteración y degradación de algunas FG-Nups. Esta alteración está relacionada directamente con la actividad de la proteasa NS2B3. Es probable que esta sea la causa de la inhibición de los sistemas de importe y exporte nuclear, así como la inhibición en el exporte de mRNAs, que puede favorecer la replicación viral y la modulación de la respuesta inmune. Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar esta implicación.

Conclusiones

- ✓ La infección con ZIKV afecta la envoltura nuclear de las células Huh-7, mediante el procesamiento de Nups.
- ✓ La proteasa recombinante NS2B-NS3 de ZIKV degrada a Nup98, Nup153 y TPR.
- ✓ La infección con ZIKV altera el tráfico núcleo-citoplasma, específicamente las vías de importina α , exportina CRM-1, Transportina 1, Transportina KNS y Transportina SR
- ✓ La proteasa NS2B-NS3 de ZIKV es la responsable de la retención de los mRNAs en núcleo
- ✓ La proteína NS3 de ZIKV se localiza en núcleo a tiempos tempranos de la infección (8 y 12h) y en el citoplasma a tiempos tardíos de la infección (16 y 24h)
- ✓ La proteína NS3 de ZIKV se importa al núcleo por la vía de importina α y se exporta del núcleo por la vía de exportina CRM-1
- ✓ La NLS monopartita (210 REAIKKRLR) de NS3 de ZIKV es responsable del importe de NS3 en núcleo.

Perspectivas

- Describir la NES responsable del transporte de NS3 de ZIKV
- Analizar si la proteína NS3 de ZIKV interactúa con proteínas nucleares.
- Analizar la integridad de otros sistemas de transporte durante la infección con ZIKV.
- Analizar si la proteína NS3 puede procesar otros componentes del núcleo.
- Analizar cómo las proteínas nucleares (C, NS3 y NS5) de ZIKV ayudan al establecimiento de la infección.
- Analizar si la mutación de la NLS y NES de la proteína NS3 de ZIKV impacta en la infección.
- Analizar si fármacos bloqueadores del transporte núcleo-citoplasma pueden ser usados como tratamiento de la infección con ZIKV.

Bibliografía

- Agis-Juárez, R. A., Galván, I., Medina, F., Daikoku, T., Padmanabhan, R., Ludert, J. E., & del Angel, R. M. (2009). Polypyrimidine tract-binding protein is relocated to the cytoplasm and is required during dengue virus infection in Vero cells. *The Journal of General Virology*, 90(Pt 12), 2893-2901. <https://doi.org/10.1099/vir.0.013433-0>
- Agnihotry, S., Pathak, R. K., Singh, D. B., Tiwari, A., & Hussain, I. (2022). Chapter 11—Protein structure prediction. En D. B. Singh & R. K. Pathak (Eds.), *Bioinformatics* (pp. 177-188). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89775-4.00023-7>
- Aksenova, V., Smith, A., Lee, H., Bhat, P., Esnault, C., Chen, S., Iben, J., Kaufhold, R., Yau, K. C., Echeverria, C., Fontoura, B., Arnaoutov, A., & Dasso, M. (2020). Nucleoporin TPR is an integral component of the TREX-2 mRNA export pathway. *Nature Communications*, 11(1), 4577. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18266-2>
- Alonso-Rangel, L., Benítez-Guerrero, T., Martínez-Vieyra, I., Cisneros, B., Martínez-Tovar, A., Winder, S. J., & Cerecedo, D. (2017). A role for dystroglycan in the pathophysiology of acute leukemic cells. *Life Sciences*, 182, 1-9. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2017.06.004>
- Armstrong, N., Hou, W., & Tang, Q. (2017). Biological and historical overview of Zika virus. *World Journal of Virology*, 6(1), 1-8. <https://doi.org/10.5501/wjv.v6.i1.1>

- Ashour, J., Laurent-Rolle, M., Shi, P.-Y., & García-Sastre, A. (2009). NS5 of Dengue Virus Mediates STAT2 Binding and Degradation. *Journal of Virology*, 83(11), 5408-5418. <https://doi.org/10.1128/JVI.02188-08>
- Aubry, M., Teissier, A., Huart, M., Merceron, S., Vanhomwegen, J., Roche, C., Vial, A. L., Teururai, S., Sicard, S., Paulous, S., Despré, P., Manuguerra, J. C., Mallet, H. P., Musso, D., Deparis, X., & Cao-Lormeau, V. M. (2017). Zika virus seroprevalence, French Polynesia, 2014-2015. *Emerging Infectious Diseases*, 23(4), 669-672. <https://doi.org/10.3201/eid2304.161549>
- Barzon, L., Trevisan, M., Sinigaglia, A., Lavezzo, E., & Palù, G. (2016). Zika virus: From pathogenesis to disease control. *FEMS Microbiology Letters*, 363(18), 1-17. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw202>
- Beck, M., & Hurt, E. (2017). The nuclear pore complex: Understanding its function through structural insight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(2), 73-89. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.147>
- Behnam, M. A. M., & Klein, C. D. P. (2020). Conformational selection in the flaviviral NS2B-NS3 protease. *Biochimie*, 174, 117-125. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.04.014>
- Bhuvanankantham, R., Chong, M.-K., & Ng, M.-L. (2009). Specific interaction of capsid protein and importin- α/β influences West Nile virus production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(1), 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.108>

- Brand, C., Bisailon, M., & Geiss, B. J. (2017a). Organization of the Flavivirus RNA Replicase Complex. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 8(6). <https://doi.org/10.1002/wrna.1437>
- Brand, C., Bisailon, M., & Geiss, B. J. (2017b). Organization of the Flavivirus RNA Replicase Complex. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 8(6), 10.1002/wrna.1437. <https://doi.org/10.1002/wrna.1437>
- Buffone, C., Martinez-Lopez, A., Fricke, T., Opp, S., Severgnini, M., Cifola, I., Petiti, L., Frabetti, S., Skorupka, K., Zadrozny, K. K., Ganser-Pornillos, B. K., Pornillos, O., Nunzio, F. D., & Diaz-Griffero, F. (2018). Nup153 Unlocks the Nuclear Pore Complex for HIV-1 Nuclear Translocation in Nondividing Cells. *Journal of Virology*, 92(19). <https://doi.org/10.1128/JVI.00648-18>
- Castelló, A., Izquierdo, J. M., Welnowska, E., & Carrasco, L. (2009a). RNA nuclear export is blocked by poliovirus 2A protease and is concomitant with nucleoporin cleavage. *Journal of cell science*, 122(Pt 20), 3799-3809. <https://doi.org/10.1242/jcs.055988>
- Castelló, A., Izquierdo, J. M., Welnowska, E., & Carrasco, L. (2009b). RNA nuclear export is blocked by poliovirus 2A protease and is concomitant with nucleoporin cleavage. *Journal of Cell Science*, 122(20), 3799-3809. <https://doi.org/10.1242/jcs.055988>
- Cazalla, D., Zhu, J., Manche, L., Huber, E., Krainer, A. R., & Cáceres, J. F. (2002). Nuclear Export and Retention Signals in the RS Domain of SR Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 22(19), 6871-6882. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.19.6871-6882.2002>

- Chen, J., Huang, S., & Chen, Z. (2010). Human cellular protein nucleoporin hNup98 interacts with influenza A virus NS2/nuclear export protein and overexpression of its GLFG repeat domain can inhibit virus propagation. *The Journal of General Virology*, 91(Pt 10), 2474-2484. <https://doi.org/10.1099/vir.0.022681-0>
- Christie, M., Chang, C.-W., Róna, G., Smith, K. M., Stewart, A. G., Takeda, A. A. S., Fontes, M. R. M., Stewart, M., Vértessy, B. G., Forwood, J. K., & Kobe, B. (2016). Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *Journal of Molecular Biology*, 428(10, Part A), 2060-2090. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.023>
- Cohen, S., Au, S., & Panté, N. (2011). How viruses access the nucleus. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(9), 1634-1645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.009>
- Collao, X., Prado, L., González, C., Vásquez, A., Araki, R., Henríquez, T., & Peña M, C. (2015). Detección de flavivirus en mosquitos (Diptera: Culicidae) de la Isla de Pascua-Chile. *Revista chilena de infectología*, 32(1), 113-116. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000200016>
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E. G., Neufeldt, C. J., Oleksiuk, O., Lampe, M., Haselmann, U., Funaya, C., Schieber, N., Ronchi, P., Schorb, M., Pruunsild, P., Schwab, Y., Chatel-Chaix, L., Ruggieri, A., & Bartenschlager, R. (2017). Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Reports*, 18(9), 2113-2123. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014>

- D'Angelo, M. A., Raices, M., Panowski, S. H., & Hetzer, M. W. (2009). Age-Dependent Deterioration of Nuclear Pore Complexes Causes a Loss of Nuclear Integrity in Postmitotic Cells. *Cell*, 136(2), 284-295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.037>
- De Jesús-González, L. A., Cervantes-Salazar, M., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Farfán-Morales, C. N., Palacios-Rápalo, S. N., Pérez-Olais, J. H., Cordero-Rivera, C. D., Hurtado-Monzón, A. M., Ruíz-Jiménez, F., Gutiérrez-Escolano, A. L., & del Ángel, R. M. (2020). The Nuclear Pore Complex: A Target for NS3 Protease of Dengue and Zika Viruses. *Viruses*, 12(6), 583. <https://doi.org/10.3390/v12060583>
- De Jesús-González, L. A., Palacios-Rápalo, S., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Cordero-Rivera, C. D., Farfan-Morales, C. N., Gutiérrez-Escolano, A. L., & del Ángel, R. M. (2021). The Nuclear Pore Complex Is a Key Target of Viral Proteases to Promote Viral Replication. *Viruses*, 13(4), 706. <https://doi.org/10.3390/v13040706>
- De Nova-Ocampo, M., Villegas-Sepúlveda, N., & del Angel, R. M. (2002). Translation Elongation Factor-1 α , La, and PTB Interact with the 3' Untranslated Region of Dengue 4 Virus RNA. *Virology*, 295(2), 337-347. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1407>
- Di Nunzio, F., Danckaert, A., Fricke, T., Perez, P., Fernandez, J., Perret, E., Roux, P., Shorte, S., Charneau, P., Diaz-Griffero, F., & Arhel, N. J. (2012a). Human Nucleoporins Promote HIV-1 Docking at the Nuclear Pore, Nuclear Import and Integration. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046037>

- Di Nunzio, F., Danckaert, A., Fricke, T., Perez, P., Fernandez, J., Perret, E., Roux, P., Shorte, S., Charneau, P., Diaz-Griffero, F., & Arhel, N. J. (2012b). Human Nucleoporins Promote HIV-1 Docking at the Nuclear Pore, Nuclear Import and Integration. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046037>
- Di Nunzio, F., Fricke, T., Miccio, A., Valle-Casuso, J. C., Perez, P., Souque, P., Rizzi, E., Severgnini, M., Mavilio, F., Charneau, P., & Diaz-Griffero, F. (2013). Nup153 and Nup98 bind the HIV-1 core and contribute to the early steps of HIV-1 replication. *Virology*, 440(1). <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.02.008>
- Díaz-Quñonez, J. A., López-Martínez, I., Torres-Longoria, B., Vázquez-Pichardo, M., Cruz-Ramírez, E., Ramírez-González, J. E., Ruiz-Matus, C., & Kuri-Morales, P. (2016). Evidence of the presence of the Zika virus in Mexico since early 2015. *Virus Genes*, 52(6), 855-857. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1384-0>
- Dong, Y., Ye, W., Yang, J., Han, P., Wang, Y., Ye, C., Weng, D., Zhang, F., Xu, Z., & Lei, Y. (2016). DDX21 translocates from nucleus to cytoplasm and stimulates the innate immune response due to dengue virus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(2), 648-653. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.120>
- Emara, M. M., Liu, H., Davis, W. G., & Brinton, M. A. (2008). Mutation of Mapped TIA-1/TIAR Binding Sites in the 3' Terminal Stem-Loop of West Nile Virus Minus-Strand RNA in an Infectious Clone Negatively Affects

- Genomic RNA Amplification. *Journal of Virology*, 82(21), 10657-10670.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00991-08>
- Faria, P. A., Chakraborty, P., Levay, A., Barber, G. N., Ezelle, H. J., Enninga, J., Arana, C., Van Deursen, J., & Fontoura, B. M. A. (2005). VSV disrupts the Rae1/mrnp41 mRNA nuclear export pathway. *Molecular Cell*, 17(1), 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.023>
- Fraser, J. E., Rawlinson, S. M., Wang, C., Jans, D. A., & Wagstaff, K. M. (2014). Investigating dengue virus nonstructural protein 5 (NS5) nuclear import. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1138, 301-328. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0348-1_19
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D., & Trono, D. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(18), 9825-9830. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23276/>
- Gandikota, C., Mohammed, F., Gandhi, L., Maisnam, D., Mattam, U., Rathore, D., Chatterjee, A., Mallick, K., Billoria, A., Prasad, V. S. V., Sepuri, N. B. V., & Venkataramana, M. (2020). Mitochondrial Import of Dengue Virus NS3 Protease and Cleavage of GrpEL1, a Cochaperone of Mitochondrial Hsp70. *Journal of Virology*, 94(17). <https://doi.org/10.1128/JVI.01178-20>
- García-Montalvo, B. M., Medina, F., & del Angel, R. M. (2004). La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA. *Virus*

Research, 102(2), 141-150.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.01.024>

Ghildyal, R., Jordan, B., Li, D., Dagher, H., Bardin, P. G., Gern, J. E., & Jans, D. A. (2009). Rhinovirus 3C protease can localize in the nucleus and alter active and passive nucleocytoplasmic transport. *Journal of Virology*, 83(14), 7349-7352. <https://doi.org/10.1128/JVI.01748-08>

Gomez, G. N., Abrar, F., Dodhia, M. P., Gonzalez, F. G., & Nag, A. (2019). SARS coronavirus protein nsp1 disrupts localization of Nup93 from the nuclear pore complex. *Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0394>

Görlich, D., & Kutay, U. (1999). Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15(1), 607-660. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.607>

Gruba, N., Martinez, J. I. R., Grzywa, R., Wysocka, M., Skoreński, M., Burmistrz, M., Łęcka, M., Lesner, A., Sieńczyk, M., & Pyrc, K. (2016). Substrate profiling of Zika virus NS2B-NS3 protease. *FEBS Letters*, 590(20), 3459-3468. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12443>

Gustin, K. E., & Sarnow, P. (2001a). Effects of poliovirus infection on nucleocytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *EMBO Journal*, 20(1-2), 240-249. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.240>

Gustin, K. E., & Sarnow, P. (2001b). Effects of poliovirus infection on nucleocytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *The EMBO Journal*, 20(1-2), 240-249. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.240>

- Gustin, K. E., & Sarnow, P. (2002a). Inhibition of Nuclear Import and Alteration of Nuclear Pore Complex Composition by Rhinovirus Inhibition of Nuclear Import and Alteration of Nuclear Pore Complex Composition by Rhinovirus. *Journal of Virology*, 76(17), 8787-8796. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.17.8787>
- Gustin, K. E., & Sarnow, P. (2002b). Inhibition of Nuclear Import and Alteration of Nuclear Pore Complex Composition by Rhinovirus. *Journal of Virology*, 76(17), 8787-8796. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.17.8787-8796.2002>
- Haffar, O. K., Popov, S., Dubrovsky, L., Agostini, I., Tang, H., Pushkarsky, T., Nadler, S. G., & Bukrinsky, M. (2000). Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Journal of Molecular Biology*, 299(2), 359-368. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3768>
- Hamid, F. B., Kim, J., & Shin, C.-G. (2015). Cellular and viral determinants of retroviral nuclear entry. *Canadian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0350>
- Hashemi, A., Roohvand, F., Ghahremani, M. H., Aghasadeghi, M. R., Vahabpour, R., Motevali, F., & Memarnejadian, A. (2012). Optimization of transfection methods for Huh-7 and Vero cells: A comparative study. *Cytology and Genetics*, 46(6), 347-353. <https://doi.org/10.3103/S0095452712060035>

- Hennessey M., F. M. and S. J. E. (2016). Zika Virus Spreads to New Areas—Regions of the Americas, May 2015—January 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(3), 55-58.
- Hertzog, J., Dias Junior, A. G., Rigby, R. E., Donald, C. L., Mayer, A., Sezgin, E., Song, C., Jin, B., Hublitz, P., Eggeling, C., Kohl, A., & Rehwinkel, J. (2018). Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. *European Journal of Immunology*, 48(7), 1120-1136. <https://doi.org/10.1002/eji.201847483>
- Hezwani, M., & Fahrenkrog, B. (2017). The functional versatility of the nuclear pore complex proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 68, 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.004>
- Hill, M. E., Kumar, A., Wells, J. A., Hobman, T. C., Julien, O., & Hardy, J. A. (2018). The Unique Cofactor Region of Zika Virus NS2B–NS3 Protease Facilitates Cleavage of Key Host Proteins. *ACS Chemical Biology*, 13(9), 2398-2405. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00508>
- Hou, W., Cruz-cosme, R., Armstrong, N., Obwolo, L. A., Wen, F., Hu, W., Luo, M.-H., & Tang, Q. (2017). Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. *Gene*, 628, 117-128. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.049>
- Huang, W. R., Chiu, H. C., Liao, T. L., Chuang, K. P., Shih, W. L., & Liu, H. J. (2015). Avian reovirus protein p17 functions as a nucleoporin Tpr suppressor leading to activation of p53, p21 and PTEN and inactivation

- of PI3K/AKT/mTOR and ERK signaling pathways. *PLoS ONE*, *10*(8), 1-31. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133699>
- Hurtado-Monzón, A. M., Cordero-Rivera, C. D., Farfan-Morales, C. N., Osuna-Ramos, J. F., Jesús-González, L. A. D., Reyes-Ruiz, J. M., & Ángel, R. M. del. (2020). The role of anti-flavivirus humoral immune response in protection and pathogenesis. *Reviews in Medical Virology*, *30*(4), e2100. <https://doi.org/10.1002/rmv.2100>
- Hutten, S., & Kehlenbach, R. H. (2007a). CRM1-mediated nuclear export: To the pore and beyond. *Trends in Cell Biology*, *17*(4), 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.02.003>
- Hutten, S., & Kehlenbach, R. H. (2007b). CRM1-mediated nuclear export: To the pore and beyond. *Trends in Cell Biology*, *17*(4), 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.02.003>
- Jahed, Z., Soheilypour, M., Peyro, M., & Mofrad, M. R. K. (2016). The LINC and NPC relationship – it's complicated! *Journal of Cell Science*, *129*(17), 3219-3229. <https://doi.org/10.1242/jcs.184184>
- Jenkins, Y., McEntee, M., Weis, K., & Greene, W. C. (1998). Characterization of HIV-1 Vpr Nuclear Import: Analysis of Signals and Pathways. *The Journal of Cell Biology*, *143*(4), 875-885. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2132945/>
- Johansson, M., Brooks, A. J., Jans, D. A., & Vasudevan, S. G. (2001). A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor

importin- β and the viral helicase, NS3. *Journal of General Virology*, 82(4), 735-745. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-4-735>

Jovanovic-Talisman, T., & Zilman, A. (2017). Protein Transport by the Nuclear Pore Complex: Simple Biophysics of a Complex Biomachine. *Biophysical Journal*, 113(1), 6-14. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.05.024>

Kabachinski, G., & Schwartz, T. U. (2015). The nuclear pore complex—Structure and function at a glance. *Journal of Cell Science*, 128(3), 423-429. <https://doi.org/10.1242/jcs.083246>

Kato, K., Ikliptikawati, D. K., Kobayashi, A., Kondo, H., Lim, K., Hazawa, M., & Wong, R. W. (2021). Overexpression of SARS-CoV-2 protein ORF6 dislocates RAE1 and NUP98 from the nuclear pore complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 536, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.115>

Ke, H., Han, M., Kim, J., Gustin, K. E., & Yoo, D. (2019). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nonstructural Protein 1 Beta Interacts with Nucleoporin 62 To Promote Viral Replication and Immune Evasion. *Journal of Virology*, 93(14). <https://doi.org/10.1128/JVI.00469-19>

König, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T. L., Bonamy, G. M. C., Irelan, J. T., Chiang, C., Tu, B. P., De Jesus, P. D., Lilley, C. E., Seidel, S., Opaluch, A. M., Caldwell, J. S., Weitzman, M. D., Kuhlen, K. L., Bandyopadhyay, S., Ideker, T., Orth, A. P., Miraglia, L. J., ... Chanda, S. K. (2008). Global analysis of host-pathogen interactions that regulate

early stage HIV-1 replication. *Cell*, 135(1), 49-60.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.032>

Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009). Six Classes of Nuclear Localization Signals Specific to Different Binding Grooves of Importin α . *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 478-485.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M807017200>

Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009). Systematic identification of yeast cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 10171-10176.

la Cour, T., Gupta, R., Rapacki, K., Skriver, K., Poulsen, F. M., & Brunak, S. (2003). NESbase version 1.0: A database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 393-396.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC165548/>

la Cour, T., Kierner, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., & Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering, Design and Selection*, 17(6), 527-536.
<https://doi.org/10.1093/protein/gzh062>

Lanciotti, R. S., Lambert, A. J., Holodniy, M., Saavedra, S., & del Carmen Castillo Signor, L. (2016). Phylogeny of zika virus in western Hemisphere, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 22(5), 933-935.
<https://doi.org/10.3201/eid2205.160065>

- Lau, S., & Weber, F. (2020). Nuclear pore protein Nup98 is involved in replication of Rift Valley fever virus and nuclear import of virulence factor NSs. *The Journal of General Virology*, *101*(7), 712-716. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001347>
- Laurent-Rolle, M., Boer, E. F., Lubick, K. J., Wolfinbarger, J. B., Carmody, A. B., Rockx, B., Liu, W., Ashour, J., Shupert, W. L., Holbrook, M. R., Barrett, A. D., Mason, P. W., Bloom, M. E., García-Sastre, A., Khromykh, A. A., & Best, S. M. (2010). The NS5 Protein of the Virulent West Nile Virus NY99 Strain Is a Potent Antagonist of Type I Interferon-Mediated JAK-STAT Signaling. *Journal of Virology*, *84*(7), 3503-3515. <https://doi.org/10.1128/JVI.01161-09>
- Li, C., Goryaynov, A., & Yang, W. (2016). The selective permeability barrier in the nuclear pore complex. *Nucleus*, *7*(5), 430-446. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1238997>
- Li, H., Saucedo-Cuevas, L., Yuan, L., Ross, D., Johansen, A., Sands, D., Stanley, V., Guemez-Gamboa, A., Gregor, A., Evans, T., Chen, S., Tan, L., Molina, H., Sheets, N., Shiryayev, S. A., Terskikh, A. V., Gladfelter, A. S., Shresta, S., Xu, Z., & Gleeson, J. G. (2019). Zika Virus Protease Cleavage of Host Protein Septin-2 Mediates Mitotic Defects in Neural Progenitors. *Neuron*, *101*(6), 1089-1098.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.010>
- Li, Y., Aksenova, V., Tingey, M., Yu, J., Ma, P., Arnaoutov, A., Chen, S., Dasso, M., & Yang, W. (2021). Distinct roles of nuclear basket proteins in directing the passage of mRNA through the nuclear pore. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences*, 118(37), e2015621118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2015621118>
- Li, Y., Phoo, W. W., Loh, Y. R., Zhang, Z., Ng, E. Y., Wang, W., Keller, T. H., Luo, D., & Kang, C. (2017). Structural characterization of the linked NS2B-NS3 protease of Zika virus. *FEBS Letters*, 591(15), 2338-2347.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.12741>
- Li, Y., Zhang, Z., Phoo, W. W., Loh, Y. R., Wang, W., Liu, S., Chen, M. W., Hung, A. W., Keller, T. H., Luo, D., & Kang, C. (2017). Structural Dynamics of Zika Virus NS2B-NS3 Protease Binding to Dipeptide Inhibitors. *Structure*, 25(8), 1242-1250.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2017.06.006>
- Li, Z., Zhang, J., & Li, H. (2017). Chapter 7 - Flavivirus NS2B/NS3 Protease: Structure, Function, and Inhibition. En S. P. Gupta (Ed.), *Viral Proteases and Their Inhibitors* (pp. 163-188). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809712-0.00007-1>
- Lin, R.-J., Chang, B.-L., Yu, H.-P., Liao, C.-L., & Lin, Y.-L. (2006). Blocking of Interferon-Induced Jak-Stat Signaling by Japanese Encephalitis Virus NS5 through a Protein Tyrosine Phosphatase-Mediated Mechanism. *Journal of Virology*, 80(12), 5908-5918.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02714-05>
- Lopez-Denman, A. J., & Mackenzie, J. M. (2017a). The IMPORTance of the nucleus during flavivirus replication. *Viruses*, 9(1), 1-11.
<https://doi.org/10.3390/v9010014>

- Lopez-Denman, A. J., & Mackenzie, J. M. (2017b). The IMPORTance of the nucleus during flavivirus replication. *Viruses*, *9*(1), 1-11. <https://doi.org/10.3390/v9010014>
- Lopez-Denman, A. J., Russo, A., Wagstaff, K. M., White, P. A., Jans, D. A., & Mackenzie, J. M. (2018). Nucleocytoplasmic shuttling of the West Nile virus RNA-dependent RNA polymerase NS5 is critical to infection. *Cellular Microbiology*, *20*(8), e12848. <https://doi.org/10.1111/cmi.12848>
- Luo, D., Wei, N., Doan, D. N., Paradkar, P. N., Chong, Y., Davidson, A. D., Kotaka, M., Lescar, J., & Vasudevan, S. G. (2010). Flexibility between the protease and helicase domains of the dengue virus NS3 protein conferred by the linker region and its functional implications. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(24), 18817-18827. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.090936>
- Luo, D., Xu, T., Hunke, C., Grüber, G., Vasudevan, S. G., & Lescar, J. (2008). Crystal Structure of the NS3 Protease-Helicase from Dengue Virus. *Journal of Virology*, *82*(1), 173-183. <https://doi.org/10.1128/JVI.01788-07>
- Mackenzie, J. (2005). Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *6*(11), 967-977. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00339.x>
- MacNamara, F. N. (1954). Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *48*(2), 139-145. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(54\)90006-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(54)90006-1)

- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W636-W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Maimon, T., Elad, N., Dahan, I., & Medalia, O. (2012). The human nuclear pore complex as revealed by cryo-electron tomography. *Structure*, *20*(6), 998-1006. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.03.025>
- Maio, F. A. D., Risso, G., Iglesias, N. G., Shah, P., Pozzi, B., Gebhard, L. G., Mammi, P., Mancini, E., Yanovsky, M. J., Andino, R., Krogan, N., Srebrow, A., & Gamarnik, A. V. (2016). The Dengue Virus NS5 Protein Intrudes in the Cellular Spliceosome and Modulates Splicing. *PLOS Pathogens*, *12*(8), e1005841. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005841>
- Malik, P., Tabarraei, A., Kehlenbach, R. H., Korfali, N., Iwasawa, R., Graham, S. V., & Schirmer, E. C. (2012). Herpes simplex virus ICP27 protein directly interacts with the nuclear pore complex through Nup62, inhibiting host nucleocytoplasmic transport pathways. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(15), 12277-12292. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.331777>
- Mazzon, M., Jones, M., Davidson, A., Chain, B., & Jacobs, M. (2009). Dengue Virus NS5 Inhibits Interferon- α Signaling by Blocking Signal Transducer and Activator of Transcription 2 Phosphorylation. *The Journal of Infectious Diseases*, *200*(8), 1261-1270. <https://doi.org/10.1086/605847>

- Medin, C. L., & Rothman, A. L. (2017). Zika virus: The agent and its biology, with relevance to pathology. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 141(1), 33-42. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0409-RA>
- Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2017). Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host and Microbe*, 21(2), 134-142. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>
- Ming, G., Tang, H., & Song, H. (2016). Advances in Zika Virus Research: Stem Cell Models, Challenges, and Opportunities. *Cell Stem Cell*, 19(6), 690-702. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.014>
- Miorin, L., Kehrer, T., Sanchez-Aparicio, M. T., Zhang, K., Cohen, P., Patel, R. S., Cupic, A., Makio, T., Mei, M., Moreno, E., Danziger, O., White, K. M., Rathnasinghe, R., Uccellini, M., Gao, S., Aydillo, T., Mena, I., Yin, X., Martin-Sancho, L., ... García-Sastre, A. (2020). SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(45), 28344-28354. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016650117>
- Mishra, P. M., Uversky, V. N., & Giri, R. (2018). Molecular Recognition Features in Zika Virus Proteome. *Journal of Molecular Biology*, 430(16), 2372-2388. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.10.018>
- Monette, A., Ajamian, L., López-Lastra, M., & Mouland, A. J. (2009). Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Induces the Cytoplasmic Retention of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 by

- Disrupting Nuclear Import. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 31350-31362. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.048736>
- Mori, Y., Okabayashi, T., Yamashita, T., Zhao, Z., Wakita, T., Yasui, K., Hasebe, F., Tadano, M., Konishi, E., Moriishi, K., & Matsuura, Y. (2005). Nuclear Localization of Japanese Encephalitis Virus Core Protein Enhances Viral Replication. *Journal of Virology*, 79(6), 3448-3458. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3448-3458.2005>
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005a). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews. Microbiology*, 3(1), 13-22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005b). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(1), 13-22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Musso, D., & Gubler, D. (2016). Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 487-524. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15.Address>
- Netsawang, J., Noisakran, S., Puttikhunt, C., Kasinrerk, W., Wongwiwat, W., Malasit, P., Yenchitsomanus, P., & Limjindaporn, T. (2010). Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus Research*, 147(2), 275-283. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.11.012>
- Neufeldt, C. J., Cortese, M., Acosta, E. G., & Bartenschlager, R. (2018). Rewiring cellular networks by members of the *Flaviviridae* family. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 125-142. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>

- Ocwieja, K. E., Brady, T. L., Ronen, K., Huegel, A., Roth, S. L., Schaller, T., James, L. C., Towers, G. J., Young, J. A. T., Chanda, S. K., König, R., Malani, N., Berry, C. C., & Bushman, F. D. (2011). HIV Integration Targeting: A Pathway Involving Transportin-3 and the Nuclear Pore Protein RanBP2. *PLoS Pathogens*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001313>
- Ogawa, Y., Miyamoto, Y., Oka, M., & Yoneda, Y. (2012). The Interaction Between Importin- α and Nup153 Promotes Importin- α/β -Mediated Nuclear Import. *Traffic*, 13(7), 934-946. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01367.x>
- OMS. (2017). *Informe Sobre La Situación Virus De Zika, Microcefalia y Síndrome De Guillain-Barre.*
- Palacios-Rápalo, S. N., De Jesús-González, L. A., Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Farfan-Morales, C. N., Gutiérrez-Escolano, A. L., & del Ángel, R. M. (2021). Nuclear localization of non-structural protein 3 (NS3) during dengue virus infection. *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05026-w>
- Park, N., Katikaneni, P., Skern, T., & Gustin, K. E. (2008a). Differential Targeting of Nuclear Pore Complex Proteins in Poliovirus-Infected Cells. *Journal of Virology*, 82(4), 1647-1655. <https://doi.org/10.1128/JVI.01670-07>
- Park, N., Katikaneni, P., Skern, T., & Gustin, K. E. (2008b). Differential Targeting of Nuclear Pore Complex Proteins in Poliovirus-Infected Cells.

- Journal of Virology*, 82(4), 1647-1655.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01670-07>
- Park, N., Skern, T., & Gustin, K. E. (2010). Specific Cleavage of the Nuclear Pore Complex Protein Nup62 by a Viral Protease. *Journal of Biological Chemistry*, 285(37), 28796-28805.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143404>
- Plourde, A. R., & Bloch, E. M. (2016). A Literature Review of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1185-1192.
<https://doi.org/10.3201/eid2207.151990>
- Porter, F. W., & Palmenberg, A. C. (2009). Leader-Induced Phosphorylation of Nucleoporins Correlates with Nuclear Trafficking Inhibition by Cardioviruses. *Journal of Virology*, 83(4), 1941-1951.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01752-08>
- Prieto, G., Fullaondo, A., & Rodriguez, J. A. (2014). Prediction of nuclear export signals using weighted regular expressions (Wregex). *Bioinformatics*, 30(9), 1220-1227. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu016>
- Prikhod'ko, G. G., Prikhod'ko, E. A., Pletnev, A. G., & Cohen, J. I. (2002). Langat Flavivirus Protease NS3 Binds Caspase-8 and Induces Apoptosis. *Journal of Virology*, 76(11), 5701-5710.
<https://doi.org/10.1128/JVI.76.11.5701-5710.2002>
- Pryor, M. J., Rawlinson, S. M., Butcher, R. E., Barton, C. L., Waterhouse, T. A., Vasudevan, S. G., Bardin, P. G., Wright, P. J., Jans, D. A., & Davidson, A. D. (2007). Nuclear Localization of Dengue Virus Nonstructural Protein 5 Through Its Importin α / β – Recognized Nuclear

Localization Sequences is Integral to Viral Infection. 18, 795-807.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00579.x>

Pumroy, R. A., & Cingolani, G. (2015). Diversification of importin- α isoforms in cellular trafficking and disease states. *The Biochemical journal*, 466(1), 13-28. <https://doi.org/10.1042/BJ20141186>

Rabaan, A. A., Bazzi, A. M., Al-Ahmed, S. H., Al-Ghaith, M. H., & Al-Tawfiq, J. A. (2017). Overview of Zika infection, epidemiology, transmission and control measures. *Journal of Infection and Public Health*, 10(2), 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.05.007>

Rather, I. A., Lone, J. B., Bajpai, V. K., Paek, W. K., & Lim, J. (2017). Zika Virus: An Emerging Worldwide Threat. *Frontiers in Microbiology*, 8(July), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01417>

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

Ren, Y., Seo, H.-S., Blobel, G., & Hoelz, A. (2010). Structural and functional analysis of the interaction between the nucleoporin Nup98 and the mRNA export factor Rae1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(23), 10406-10411. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005389107>

Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., Cervantes-Salazar, M., Lagunes Guillen, A. E., Chávez-Munguía, B., Salas-Benito, J. S., & Del Ángel, R.

- M. (2018). Strand-like structures and the nonstructural proteins 5, 3 and 1 are present in the nucleus of mosquito cells infected with dengue virus. *Virology*, 515, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.014>
- Ricour, C., Delhay, S., Hato, S. V., Olenyik, T. D., Michel, B., van Kuppeveld, F. J. M., Gustin, K. E., & Michiels, T. (2009). Inhibition of mRNA export and IRF-3 dimerization by Theiler's virus leader protein. *The Journal of general virology*, 90(Pt 1), 177-186. <https://doi.org/10.1099/vir.0.005678-0>
- Robijns, J., Houthaeve, G., Braeckmans, K., & De Vos, W. H. (2018). Chapter Five—Loss of Nuclear Envelope Integrity in Aging and Disease. En L. Galluzzi (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 336, pp. 205-222). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.013>
- Rothballer, A., & Kutay, U. (2012). SnapShot: The Nuclear Envelope I. *Cell*, 150(4), 868-868.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.024>
- Saiz, J. C., Vázquez-Calvo, Á., Blázquez, A. B., Merino-Ramos, T., Escribano-Romero, E., & Martín-Acebes, M. A. (2016). Zika virus: The latest newcomer. *Frontiers in Microbiology*, 7(496), 1-19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00496>
- Salud, S. de. (2022). *Casos Confirmados de Infección por Virus Zika 2022*. gob.mx. <http://www.gob.mx/salud/documentos/casos-confirmados-de-infeccion-por-virus-zika-2022>
- Santos, V. S., Oliveira, S. J. G., Gurgel, R. Q., Lima, D. R. R., dos Santos, C. A., & Martins-Filho, P. R. S. (2017). Microcephaly in Twins Due to the

- Zika Virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(1), 151-154. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-1021>
- Satterly, N., Tsai, P.-L., van Deursen, J., Nussenzveig, D. R., Wang, Y., Faria, P. A., Levay, A., Levy, D. E., & Fontoura, B. M. A. (2007). Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(6), 1853-1858. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610977104>
- Schwartz, T. U. (2016). The Structure Inventory of the Nuclear Pore Complex. *Journal of molecular biology*, 428(10 Pt A), 1986-2000. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.015>
- ŞENBAŞ AKYAZI, B., PİRİNÇAL, A., KAWAGUCHI, A., NAGATA, K., & TURAN, K. (2020). Interaction of influenza A virus NS2/NEP protein with the amino-terminal part of Nup214. *Turkish Journal of Biology*, 44(2), 82-92. <https://doi.org/10.3906/biy-1909-49>
- Sheng, Z.-Y., Gao, N., Wang, Z.-Y., Cui, X.-Y., Zhou, D.-S., Fan, D.-Y., Chen, H., Wang, P.-G., & An, J. (2017). Sertoli Cells Are Susceptible to ZIKV Infection in Mouse Testis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(June), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00272>
- Shuaib, W., Stanazai, H., Abazid, A. G., & Mattar, A. A. (2016). Re-Emergence of Zika Virus: A Review on Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *The American Journal of Medicine*, 129(8), 879.e7-879.e12. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2016.02.027>

- Sigrist, C. J. A., de Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B. A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., & Xenarios, I. (2013). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D344-D347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B., & Stapleton, J. T. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *The Journal of General Virology*, *98*(1), 2-3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*, *308*, 50-64. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001>
- Tangsongcharoen, C., Roytrakul, S., & Smith, D. R. (2019). Analysis of cellular proteome changes in response to ZIKV NS2B-NS3 protease expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1867*(2), 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.10.016>
- Tilgner, M., & Shi, P. Y. (2004). Structure and function of the 3'terminal six nucleotides of the West Nile virus genome in viral replication. *Journal of virology*, *78*(15), 8159. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8159>
- Tognarelli, J., Ulloa, S., Villagra, E., Lagos, J., Aguayo, C., Fasce, R., Parra, B., Mora, J., Becerra, N., Lagos, N., Vera, L., Olivares, B., Vilches, M., & Fernández, J. (2016). A report on the outbreak of Zika virus on Easter

- Island, South Pacific, 2014. *Archives of Virology*, 161(3), 665-668.
<https://doi.org/10.1007/s00705-015-2695-5>
- Twyffels, L., Gueydan, C., & Kruys, V. (2014). Transportin-1 and Transportin-2: Protein nuclear import and beyond. *FEBS Letters*, 588(10), 1857-1868. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.023>
- Uchil, P. D., Kumar, A. V. A., & Satchidanandam, V. (2006). Nuclear Localization of Flavivirus RNA Synthesis in Infected Cells. *Journal of Virology*, 80(11), 5451-5464. <https://doi.org/10.1128/JVI.01982-05>
- Vargas, J. D., Hatch, E. M., Anderson, D. J., & Hetzer, M. W. (2012). Transient nuclear envelope rupturing during interphase in human cancer cells. *Nucleus*, 3(1), 88-100. <https://doi.org/10.4161/nucl.18954>
- Wagstaff, K. M., Sivakumaran, H., Heaton, S. M., Harrich, D., & Jans, D. A. (2012). Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *The Biochemical Journal*, 443(3), 851-856. <https://doi.org/10.1042/BJ20120150>
- Walker, E. J., Younessi, P., Fulcher, A. J., McCuaig, R., Thomas, B. J., Bardin, P. G., Jans, D. A., & Ghildyal, R. (2013). Rhinovirus 3C Protease Facilitates Specific Nucleoporin Cleavage and Mislocalisation of Nuclear Proteins in Infected Host Cells. *PLOS ONE*, 8(8), e71316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071316>
- Wang, C., Yang, S. N. Y., Smith, K., Forwood, J. K., & Jans, D. A. (2017). Nuclear import inhibitor N-(4-hydroxyphenyl) retinamide targets Zika virus (ZIKV) nonstructural protein 5 to inhibit ZIKV infection. *Biochemical*

and Biophysical Research Communications, 493(4), 1555-1559.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.016>

Watters, K., Inankur, B., Gardiner, J. C., Warrick, J., Sherer, N. M., Yin, J., & Palmenberg, A. C. (2017). Differential Disruption of Nucleocytoplasmic Trafficking Pathways by Rhinovirus 2A Proteases. *Journal of Virology*, 91(8). <https://doi.org/10.1128/JVI.02472-16>

Watters, K., & Palmenberg, A. C. (2011a). Differential processing of nuclear pore complex proteins by rhinovirus 2A proteases from different species and serotypes. *Journal of virology*, 85(20), 10874-10883. <https://doi.org/10.1128/JVI.00718-11>

Watters, K., & Palmenberg, A. C. (2011b). Differential Processing of Nuclear Pore Complex Proteins by Rhinovirus 2A Proteases from Different Species and Serotypes. *Journal of Virology*, 85(20), 10874-10883. <https://doi.org/10.1128/JVI.00718-11>

Weng, G., Wang, E., Wang, Z., Liu, H., Zhu, F., Li, D., & Hou, T. (2019). HawkDock: A web server to predict and analyze the protein–protein complex based on computational docking and MM/GBSA. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W322-W330. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz397>

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

Wölk, B., Sansonno, D., Kräusslich, H. G., Dammacco, F., Rice, C. M., Blum, H. E., & Moradpour, D. (2000). Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex

- expressed in tetracycline-regulated cell lines. *Journal of Virology*, 74(5), 2293-2304. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.5.2293-2304.2000>
- Wubben, J. M., Atkinson, S. C., & Borg, N. A. (2020). The Role of Protein Disorder in Nuclear Transport and in Its Subversion by Viruses. *Cells*, 9(12), 2654. <https://doi.org/10.3390/cells9122654>
- Xu, D., Farmer, A., & Chook, Y. M. (2010a). Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin- β proteins. *Current opinion in structural biology*, 20(6), 782-790. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.09.008>
- Xu, D., Farmer, A., & Chook, Y. M. (2010b). Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin- β proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(6), 782-790. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.09.008>
- Xu, D., Marquis, K., Pei, J., Fu, S.-C., Cağatay, T., Grishin, N. V., & Chook, Y. M. (2015). LocNES: A computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(9), 1357-1365. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu826>
- Yan, Y., Tao, H., He, J., & Huang, S.-Y. (2020). The HDock server for integrated protein–protein docking. *Nature Protocols*, 15(5), 1829-1852. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0312-x>
- Yocupicio-Monroy, M., Padmanabhan, R., Medina, F., & del Angel, R. M. (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. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.07.042>

- Zanluca, C., De Melo, V. C. A., Mosimann, A. L. P., Dos Santos, G. I. V., dos Santos, C. N. D., & Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), 569-572. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>
- Zhou, Y., Zhao, Y., Gao, Y., Hu, W., Qu, Y., Lou, N., Zhu, Y., Zhang, X., & Yang, H. (2017). Hepatitis C virus NS3 protein enhances hepatocellular carcinoma cell invasion by promoting PPM1A ubiquitination and degradation. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0510-8>