



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“PARTICIPACIÓN DEL CITOESQUELETO EN EL TRÁFICO DE LA
PROTEÍNA NS1 DEL VIRUS DEL DENGUE EN CÉLULAS DE
MOSQUITO”**

TESIS

Que presenta:

L.B.T Juan Manuel Castillo Martínez

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**Director de la tesis:
DR. JUAN ERNESTO LUDERT LEÓN**

CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO 2020



“Non terrae plus ultra”

AGRADECIMIENTOS

A todos los que hicieron posible este trabajo.

Al CONACYT por el apoyo de beca (181220005) otorgado durante el periodo de ejecución de la presente tesis.

COMITÉ TUTORAL

Tutor de tesis:

Dr. Juan E. Ludert Leon

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINESTAV-IPN

Asesor:

Dra. Ana Lorena Escolano

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV-IPN

Asesor:

Patricia Talamás Rohana

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV-IPN

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
RESUMEN GRÁFICO	8
INTRODUCCIÓN	9
1. Antecedentes.	9
2. El virus del dengue	10
3. La proteína no estructural 1 (NS1) del virus del dengue	12
4. El citoesqueleto y sus proteínas accesorias	15
5. El citoesqueleto en la infección por flavivirus	19
Ingreso del virus a su célula blanco	19
Transporte transcitoplasmático	20
Egreso del virus de las células	21
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Cultivos celulares	27
2. Virus	27
3. Ensayos de viabilidad celular	27
4. Evaluación del efecto de colchicina	28
5. Secreción de NS1 y partículas infecciosas en los sobrenadantes de células tratadas con colchicina.	29
6. Ensayo de unidades formadoras de foco (UFF) para la determinación del título viral	29
7. Medición de los niveles de NS1 secretados por ensayos de ELISA.	30
8. Ensayos de co-localización entre la proteína NS1 de DENV y la proteína motora DYNC1H1 en células de mosquito	30
9. Determinación de la interacción de las proteínas motoras MYO1C, DYNC1H1 y KLC1 con NS1 de DENV mediante ensayos de ligación por proximidad	31

10. Análisis estadístico	32
RESULTADOS	33
1. Determinación de las concentraciones no letales de colchicina en células de mosquito.	33
2. Efecto de las concentraciones no letales de colchicina sobre el citoesqueleto de células de mosquito.	34
3. Efecto de la colchicina sobre la secreción de la proteína NS1 en células de mosquito infectadas con DENV y ZIKV.....	35
4. Efecto de colchicina sobre la secreción de viriones en células de mosquito infectadas con DENV y ZIKV.....	37
5. Colocalización e interacción entre las proteínas MYO1C, DYNC1H1 y KLC1 y la proteína viral NS1 del DENV en células de mosquito.....	39
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	46
PERSPECTIVAS.....	46
REFERENCIAS	47

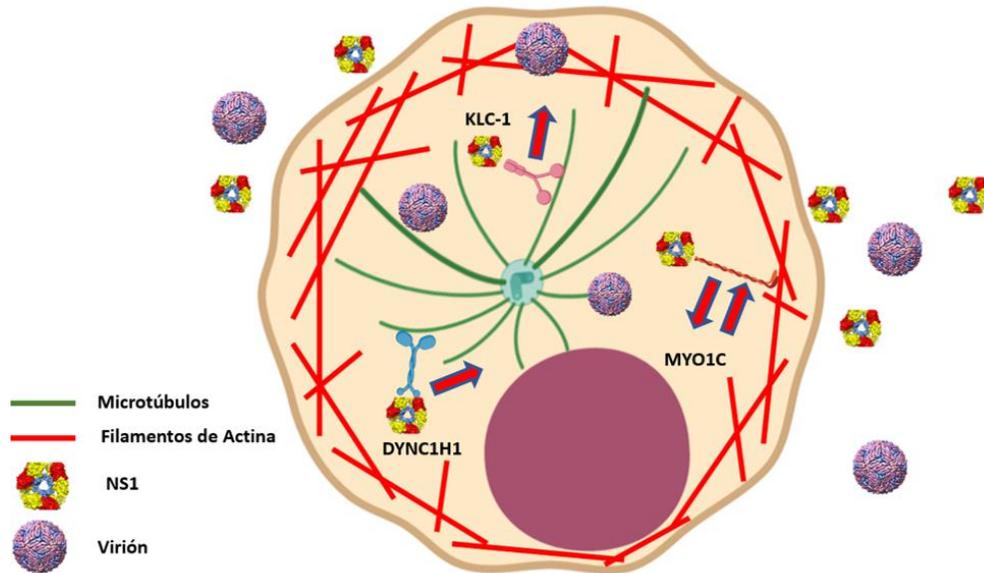
RESUMEN

El virus del dengue (DENV) pertenece al género *Flavivirus*, del cual se han identificado 4 serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) todos transmitidos por mosquitos del género *Aedes sp.* El genoma del DENV está compuesto por un ARN de cadena sencilla de polaridad positiva que codifica para 3 proteínas estructurales (C, prM, E) y para 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). La NS1 destaca por ser una proteína multifuncional que además se secreta al medio extracelular. Mientras que en células de vertebrados la proteína NS1 es secretada siguiendo la llamada ruta clásica o constitutiva, vía el complejo de Golgi, en células de mosquito la NS1 es secretada siguiendo una ruta no convencional, dependiente del complejo chaperón de caveolina. Sin embargo, se desconocen los mecanismos y componentes que utiliza la NS1 para viajar desde el retículo endoplásmico rugoso hasta alcanzar la membrana celular en las células de mosquito. Ensayos de proteómica hechos en células C6/36, derivadas de *Aedes aegypti*, mostraron que la NS1 interactúa con elementos del citoesqueleto de actina, tubulina y de proteínas motoras como la cadena pesada de la dineína 1 (DYNC1H1), la cadena ligera de la kinesina 1 (KLC1) y la miosina no convencional 1c (MYO1C). Estas proteínas motoras están involucradas en el transporte de diversos cargos como proteínas, organelos y vesículas a través del medio intracelular, utilizando para este propósito, el citoesqueleto de actina (miosinas no convencionales) y tubulina (dineína y kinesina). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación del citoesqueleto de actina y tubulina, así como de las proteínas motoras MYO1C, DYNC1H1 y KLC1 en el transporte hacia el medio extracelular de la proteína NS1 del DENV en células de mosquito infectadas. Los resultados indican que el tratamiento de células con concentraciones no-toxicas de colchicina (una droga que inhibe el citoesqueleto de tubulina), reduce la secreción de NS1 y de viriones al espacio extracelular. Además, se obtuvo evidencia experimental que indica que NS1 interactúa directamente con DYNC1H1, KLC1 y MYO1C, en el citoplasma de células de mosquito. Estos resultados sugieren que el citoesqueleto de las células de mosquito participa en el tráfico de la proteína NS1 y del virión al medio extracelular.

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) belongs to the genus *Flavivirus*, of which 4 serotypes have been identified (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) and all are transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes* sp. The DENV genome is made up of a single strand RNA of positive polarity that encodes for 3 structural proteins (C, prM, E) and 7 non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). NS1 stands out for being a multifunctional protein that is also secreted to the extracellular environment. Whereas in vertebrate cells the NS1 protein is secreted following the so-called classical or constitutive route, via the Golgi complex, in mosquito cells NS1 is secreted following an unconventional route, dependent on the caveolin chaperone complex. However, the mechanisms and components that NS1 uses to travel from the rough endoplasmic reticulum to the cell membrane in mosquito cells are unknown. Proteomic analysis carried out in the *Aedes aegypti* derived C6/36 cells indicated that NS1 interacts with elements of the actin, tubulin, and motor protein cytoskeleton such as dynein 1 heavy chain (DYNC1H1), kinesin 1 light chain (KLC1), and unconventional myosin 1c. (MYO1C). Motor proteins are involved in the transport of various cargos such as proteins, organelles, and vesicles through the intracellular medium, using for this purpose the actin cytoskeleton (unconventional myosins) and tubulin (dynein and kinesin). The objective of the following work was to evaluate the participation of the actin and tubulin cytoskeleton, as well as the MYO1C, DYNC1H1 and KLC1 motor proteins in the transport to the extracellular medium of the DENV protein NS1 in infected mosquito cells. The results indicate that treatment of cells with non-toxic concentrations of colchicine (a drug that inhibits the tubulin cytoskeleton) reduces the secretion of NS1 and virions into the extracellular space. Furthermore, experimental evidence was obtained indicating that NS1 interacts directly with DYNC1H1, KLC1 and MYO1C, in the cytoplasm of mosquito cells. These results suggest that the cytoskeleton of mosquito cells participates in the trafficking of the NS1 protein and the virion to the extracellular medium.

RESUMEN GRÁFICO



Se encontró interacción entre elementos esenciales del sistema de transporte citoesquelético y la proteína NS1 de DENV, sugiriendo que DENV y probablemente otros flavivirus usan el sistema de transporte citoesquelético para movilizar sus cargos virales, cumpliendo así con su ciclo de replicación.

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes.

El dengue es una enfermedad cuya incidencia ha crecido dramáticamente en los últimos años; se calcula que aproximadamente la mitad de la población del planeta se encuentra en riesgo de contraerla, y que anualmente ocurren entre 100 y 400 millones de infecciones (WHO,2020).

El dengue en sus manifestaciones clínicas, se caracteriza por ser una enfermedad incapacitante, en donde se presentan síntomas como fiebre, dolor de cabeza severo, dolor retro orbital, mialgia, artralgia, malestar gastrointestinal y sarpullido; puede además, progresar a un cuadro más severo en donde se presentan síntomas como fuga capilar, sangrado y trombocitopenia (Guilarde et al., 2008). Sin embargo, es importante señalar que la mayoría de las infecciones con el virus del dengue, cursan de manera asintomática (WHO ,2020). Cuando la enfermedad cursa de manera leve, los síntomas son tratables sin hospitalización y debido a que sus síntomas son confundidos con otras enfermedades febriles, una cantidad importante de casos son mal diagnosticados lo que hace difícil el manejo de esta enfermedad (Waggoner et al., 2016). Antes de 1970 solo se había registrado epidemias en 9 países, ahora la enfermedad es endémica en más de 100 países en las regiones de África, América, el este del Mediterráneo, sureste de Asia, y el Pacífico Occidental (WHO, 2020).

La transmisión se lleva a cabo principalmente en zonas urbanas tropicales. El ciclo comienza cuando un mosquito hembra, del género *Aedes* sp. se alimenta de la sangre de un humano infectado que se encuentre en la fase virémica de la enfermedad; entonces comienza el periodo de incubación extrínseco en el que el intestino medio del vector se infecta, propagando la infección a los demás tejidos en un lapso de entre 8 a 10 días; finalmente, una vez que las glándulas salivares se infectan, el mosquito puede transmitir al virus al alimentarse de la sangre de otro humano (Gubler et al., 2014).

Dentro del huésped vertebrado comienza el periodo de incubación intrínseco, el cual toma entre 4 y 10 días. En el humano, células del linaje monocítico como macrófagos, células dendríticas y células de Langerhans, infectadas, migran a los nódulos linfáticos, lo que ocasiona un reclutamiento de monocitos y macrófagos que también serán infectados; lo anterior resulta en una infección del sistema linfático y de todo el linaje mononuclear, que incluye a monocitos derivados de sangre, células dendríticas mieloides y macrófagos del bazo e hígado (Johnston, Halliday, & King, 2000; Marovich et al., 2001).

2. El virus del dengue

El agente etiológico del dengue, es el virus del dengue (DENV), el cuál pertenece al género *Flavivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*, y es un virus de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva, del cual se han identificado 4 serotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) (Martina, Koraka, & Osterhaus, 2009). El DENV codifica en su genoma 3 proteínas estructurales denominadas membrana (M), cápside (C) y envoltura (E) que conforman el virión; y por 7 proteínas no estructurales denominadas proteína no estructural 1 (NS1), NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, las cuales participan en funciones de andamiaje, enzimáticas e inhibición de la respuesta innata de la célula, entre otras funciones (Figura1).

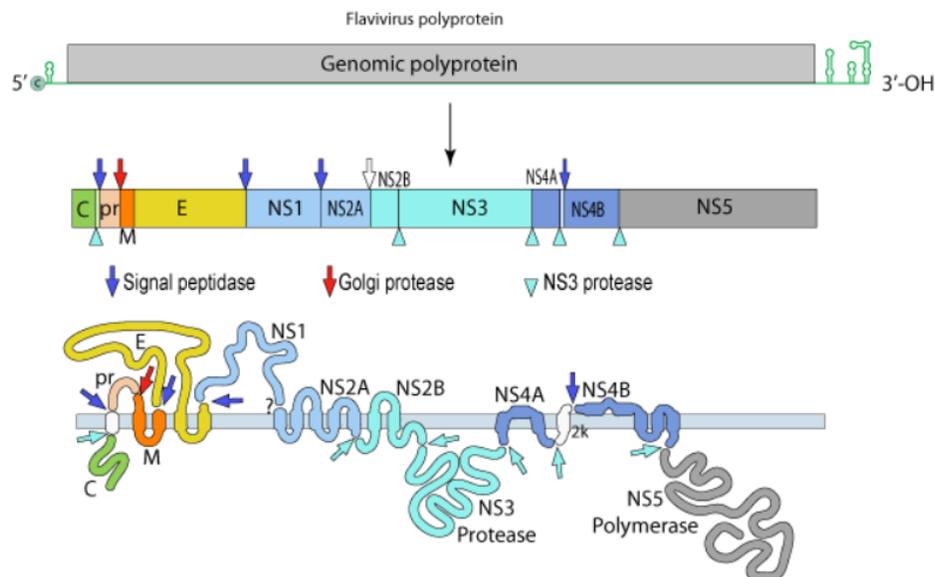


Figura1. Estructura y distribución de la poliproteína del DENV. El DENV cuenta con un genoma de ARN de polaridad positiva de una sola cadena, su extremo 3' no está poliadenilado y forma un bucle, mientras que el extremo 5' está metilado para así permitir la traducción. Tomado de: ViralZone. (2020)

Hasta la fecha se ha descrito que el DENV se une a la célula blanco a través de receptores como DC-SIGN/L-SIGN, heparán sulfato, entre otros (Hidari & Suzuki, 2011); al interactuar con su receptor se dispara la endocitosis mediada por clatrina y viaja a través del citoplasma dentro de endosomas, los cuales gradualmente aumentan su pH, esto ocasiona que la membrana viral se fusione con la membrana endosomal a través de la proteína E. Al fusionarse con la membrana, el material genético del DENV se libera al citoplasma, el cual es traducido en una poliproteína viral, con capacidad de insertarse en la membrana del retículo endoplásmico (RE). En estrecha asociación con el RE se sintetizan proteínas y material genético *de novo*. Durante su ciclo de replicación, los flavivirus se caracterizan por hacer uso extensivo de las membranas de la célula huésped (Pierson & Diamond, 2012) ya que la proteína C y los nuevos genomas se ensamblan cerca de los complejos de replicación y se adhieren al lumen del RE (Gillespie, Hoenen, Morgan, & Mackenzie, 2010), y es ahí donde adquieren las proteínas prM y E. La proteína prM debe ser procesada por la proteína celular furina (Elshuber, Allison, Heinz, & Mandl, 2003), mientras que la proteína E sufre un cambio de conformación mediado por los cambios graduales de pH que se dan de cis a trans-Golgi (Yu et al., 2008); solo cuando se cumplen los dos eventos mencionados anteriormente se considera al virión maduro, por lo tanto es capaz de salir de la célula e infectar a otra (Figura 2).

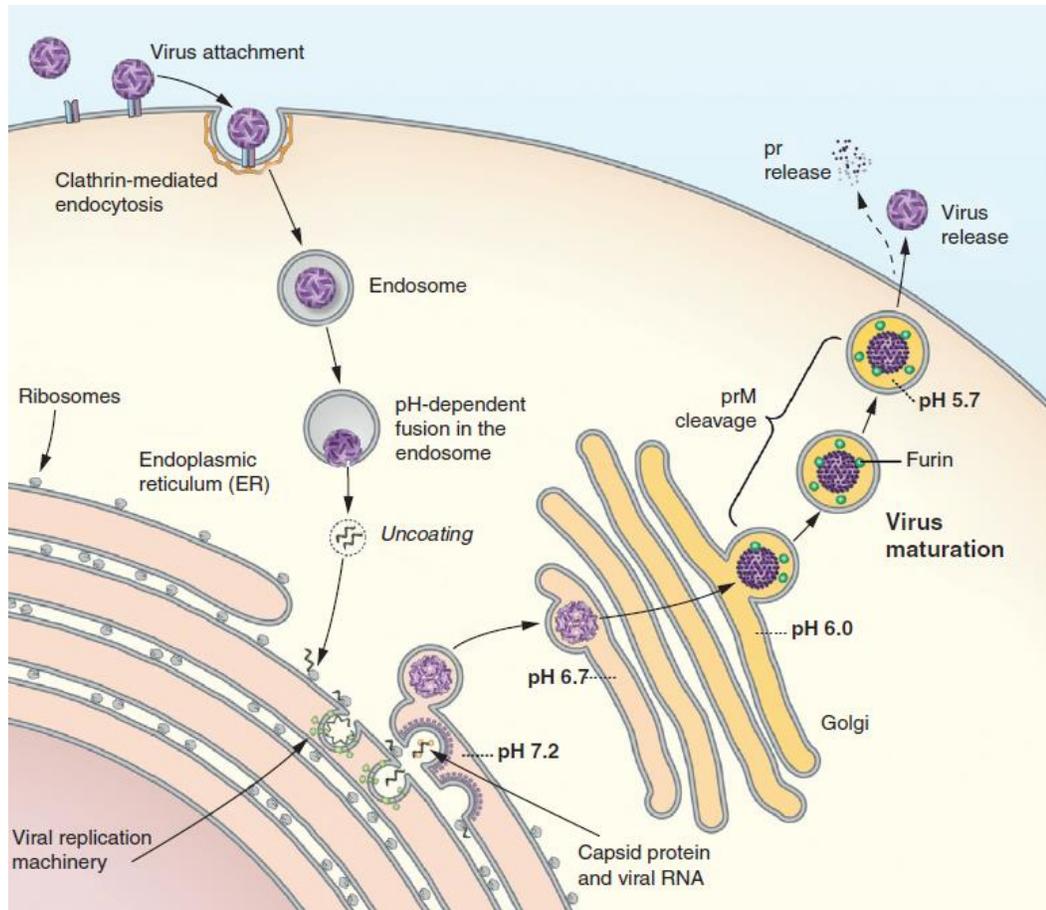


Figura 2. Ciclo de replicación del DENV. El DENV depende de la proteína E para liberar su material genético al citoplasma y para poder madurar correctamente un los pasos finales de su exocitosis. El viri3n usa cisternas del aparato de Gogi para secretarse y madurar correctamente, esta es una caracter3stica que define a los flavivirus, Tomade de (Pierson & Diamond, 2012)

3. La prote3na no estructural 1 (NS1) del virus del dengue

Una de las prote3nas no estructurales m3s estudiadas del virus del dengue es la prote3na NS1. Esta se expresa solamente por flavivirus transmitidos por mosquitos, como los son los virus del dengue, Zika y fiebre amarilla. La prote3na NS1 es una prote3na multifuncional que dentro de la c3lula se encuentra como d3mero, pero que tambi3n es secretada eficientemente de las c3lulas infectadas, en forma de hex3mero (Figura 4). La estructura cristalogr3fica de NS1 fue resuelta por Akey et al (2014); la prote3na

monomérica mostró tiene 3 dominios principales denominados dominios beta, escalera (escalera) y ala (wing) y poseer una cara hidrofílica, compuesta básicamente por los dominios de escalera y ala y una cara hidrofóbica, formada principalmente por el tercer dominio beta-roll, asociada a membranas (Figura 4). La secuencia primaria de la NS1 presenta dos sitios de glicosilación, ambos de importancia para las funciones de NS1, aunque no para la dimerización y la secreción (Yap et al., 2017). La forma dimérica de la proteína, formada por la asociación de dos monómeros a través de sus dominios beta y de escalera, participa en procesos intracelulares como traducción, glicólisis, transporte, respuesta a estrés, andamiaje y ensamble de partículas virales y en inhibición de la respuesta inmune innata (Watterson, Modhiran, & Young, 2016). La forma hexamérica secretada circula en el suero de los pacientes durante la fase aguda del dengue y se ha asociado a la patogénesis de la enfermedad a través de varios mecanismos que incluyen la inhibición de la cascada del complemento y de la cascada de coagulación, desestabilización de uniones estrechas y ruptura del glicocálix (Modhiran et al., 2015; Puerta-Guardo, Glasner, & Harris, 2016). Es interesante hacer notar que la estructura del hexámero de NS1 se ha descrito como un barril hueco (cuyo interior está conformado por las regiones hidrofóbicas de la proteína) cargado de lípidos que incluyen colesterol, triglicéridos y fosfolípidos (Gutsche et al., 2011); es decir, que la forma secretada de NS1 es una verdadera lipoproteína. En células de vertebrados, la proteína NS1 se secreta siguiendo la ruta clásica de secreción, desde el lumen del RER, a través del aparato de Golgi y hasta alcanzar la membrana plasmática (Flamand et al., 1999). A diferencia de los que ocurre en células de vertebrados, en células de invertebrados se ha demostrado que NS1 es secretada siguiendo una ruta no convencional (Ramirez & Ludert, 2019), la cual no depende del aparato de Golgi, y se caracteriza por depender del complejo chaperón de caveolina (CCC). El CCC participa en el transporte del colesterol sintetizado de novo, desde el retículo endoplásmico rugoso a la membrana plasmática, lo cual sugiere que NS1 está secuestrando esta vía de transporte del colesterol.

La detección de la forma circulante de NS1 en el suero de los pacientes se utiliza como marcador diagnóstico del dengue y también se ha utilizado la detección de NS1 para identificar en campo, mosquitos infectados (Ambrose, Sekaran, & Azizan, 2017; Tan, Wong, Li, Vythilingam, & Ng, 2011).

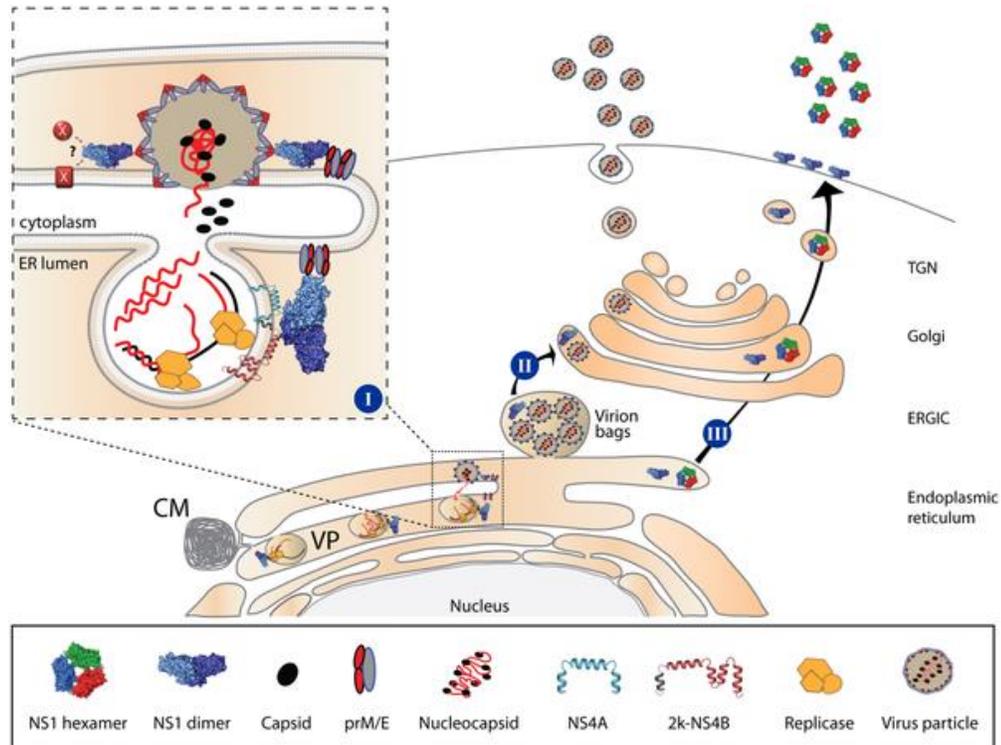


Figura 3. Ubicación intracelular y secreción de la NS1 en células de vertebrados. La NS1 al ser una proteína multifuncional, se encuentra en diferentes localizaciones subcelulares. Tomado de Scaturro et al. 2015)

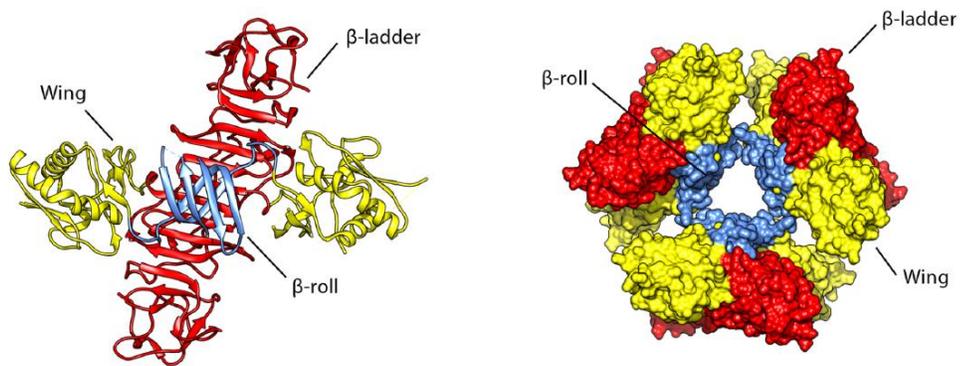


Figura 4. Estructura 3D de NS1. En la parte izquierda se muestra el dímero y en la derecha el hexámero. Los dominios ala, escalera y beta-rol se señalan en amarillo, rojo y azul, respectivamente. Tomado de: Scaturro, Cortese, Chatel-Chaix, Fischl, & Bartenschlager, 2015)

4. El citoesqueleto y sus proteínas accesorias

El citoesqueleto es un sistema que coordina y conecta los diferentes organelos celulares a través de tres grupos de proteínas conocidas como microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios.

Los microfilamentos, formados de monómeros de actina, están unidos a la membrana celular por su cara interna (Svitkina, 2018), forman una esfera cortical que da soporte a la célula impidiendo que la presión del medio extracelular ocasione daños en la membrana (Aghamohammadzadeh & Ayscough, 2009; Nickaeen, Berro, Pollard, & Slepchenko, 2019); además, se reorganiza para permitir la entrada y salida de elementos que deben atravesar la membrana (Gutiérrez, 2012; Papadopulos, 2017; Tran & Ten Hagen, 2017). Sobre los microfilamentos se acoplan y desplazan diversas proteínas conocidas como proteínas accesorias, las cuales distribuyen una gran cantidad de elementos celulares. También están involucrados en la motilidad celular, formando estructuras que responden de manera específica a estímulos extracelulares (Diz-Muñoz, Fletcher, & Weiner, 2013).

Los microtúbulos, formados de monómeros alternados de alfa y beta tubulina, son estructuras claves durante el proceso de división celular (Dumontet et al., 1996). En células en reposo, los microtúbulos participan en el transporte de cargos, y en distribuir y comunicar organelos haciendo uso de sus propias proteínas accesorias; además, dan soporte a la célula (Brouhard & Rice, 2018).

Los filamentos intermedios están formados de una gran cantidad de proteínas (laminina, vimentina, queratina, entre otros) y su proporción varía dependiendo del tipo celular (Peter & Stick, 2015); además, a diferencia de los

microfilamentos y de los microtúbulos, se encuentran tanto en el núcleo como en el citoplasma (Mitchell et al., 2015; Turgay & Medalia, 2017). En comparación con los microfilamentos y los microtúbulos, los filamentos intermedios son extremadamente estables y no presentan polaridad (Etienne-Manneville, 2018).

Los microfilamentos y los microtúbulos tienen una polaridad (negativa y positiva), la negativa da origen de su polimerización y la positiva es el extremo al que se incorporan monómeros de sus distintas proteínas. Ambos son altamente dinámicos, se reorganizan constantemente y son los responsables de darle forma a la célula.

Para llevar a cabo sus funciones, los elementos del citoesqueleto dependen de una serie de proteínas accesorias conocidas como proteínas motoras accesorias (Bezanilla, Gladfelter, Kovar, & Lee, 2015). Las proteínas accesorias poseen la función de desplazarse a través del citoesqueleto de actina y tubulina, debido al cambio de afinidad alternando entre una región específica de la proteína motora y el citoesqueleto. Este cambio de afinidad lo ocasiona un cambio de conformación en una región que es capaz de intercambiar nucleótidos trifosfato y el consumo de energía (Bhabha, Johnson, Schroeder, & Vale, 2016; Kolomeisky, 2013a).

Las proteínas motoras accesorias de los microfilamentos son conocidas como miosinas motoras; estas intercambian ATP y miembros de sus familias pueden desplazarse exclusivamente hacia el extremo negativo o positivo del filamento (Figura 5)(De La Cruz & Ostap, 2004). Los microtúbulos cuentan con dos proteínas motoras accesorias, la dineína y la kinesina. La dineína intercambia ATP y se desplaza solamente al extremo negativo, mientras que las kinesinas intercambian GTP y hay miembros de su familia que se desplazan hacia el extremo negativo y otros al positivo (Hirokawa et al., 2015; Reck-Peterson et al., 2018) (Figura 5).

Las proteínas motoras accesorias son complejos proteicos, formados de una gran variedad de proteínas. En el caso del complejo dineína hay proteínas

(cadenas pesadas) que interactúan directamente con los microtúbulos y también cuentan con una región encargada de intercambiar ATP; existen otras proteínas (cadenas ligeras o adaptadores) cuya función es acoplarse a regiones específicas de las cadenas pesadas por un extremo y por el otro unirse a moléculas cargo, que serán transportadas de manera coordinada por el complejo dineína; estos cargos pueden ser proteínas, complejos proteicos, organelos y vesículas. La manera en que esto ocurre y es regulado es que el complejo dineína puede existir en diferentes configuraciones, cada una de estas configuraciones que además se conforma de proteínas diferentes, tiene afinidad por sitios específicos dentro de la célula, así como los cargos que transporta son específicos para una configuración del complejo de dineína (Reck-Peterson et al., 2018).

El complejo kinesina cuenta con una cadena pesada que se une directamente a los microtúbulos e intercambia GTP, posee proteínas adaptadoras que unen al cargo con la cadena pesada, del mismo modo que el complejo dineína; este complejo puede existir en varias configuraciones que tienen afinidad por diferentes localizaciones subcelulares (Hirokawa et al., 2009).

Las miosinas son una excepción, ya que son proteínas individuales, que se unen a los microfilamentos, intercambian ATP y se unen a los microfilamentos sin la ayuda de proteínas adaptadoras descritas hasta la fecha (De La Cruz & Ostap, 2004). La familia de las miosinas motoras cuenta con miembros capaces de desplazarse a sitios específicos de los microfilamentos, están involucradas en los pasos finales de la exocitosis de diversos cargos, generando fuerzas de tensión o ayudando en la reorganización del citoesqueleto de actina (Bond et al., 2011).

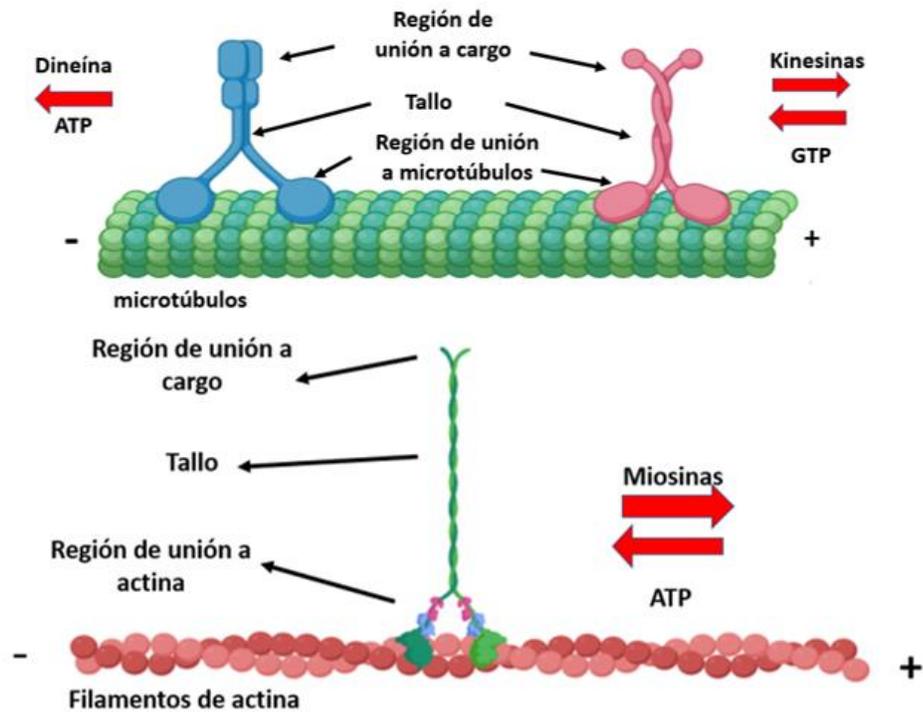


Figura 5. Representación de las proteínas motoras accesorias. En el panel superior se muestra una representación de las proteínas motoras accesorias exclusivas de los microtúbulos, así como sus regiones generalizadas y el tipo de nucleótido trifosfato que intercambian para desplazarse, mientras en el panel inferior se representan las proteínas motoras accesorias exclusivas de los microfilamentos.

5. El citoesqueleto en la infección por flavivirus

A través de la evolución, los virus al ser entidades totalmente dependientes de la célula, han desarrollado estrategias para aprovechar todos los sistemas y elementos celulares; el sistema de transporte transcitoplasmático y las proteínas miembro de este sistema no son una excepción. A continuación se muestran algunas estrategias que utilizan los *Flavivirus* para cumplir con su ciclo de replicación exclusivamente en células de vertebrado, al manipular al citoesqueleto y sus proteínas accesorias.

Ingreso del virus a su célula blanco

Se ha observado que en células de vertebrado al perturbar el citoesqueleto de actina mediante fármacos, la replicación del DENV y del virus del oeste de Nilo (WNV) se afecta considerablemente (Colpitts et al., 2011); además se sabe que el WNV y el DENV remodelan el anillo cortical de actina al usar como vía de entrada la endocitosis mediada por clatrina y al activar las GTPasas de Rho (Figura 6) (Chu & Ng, 2004; Fraiser et al., 2013). En otros estudios se determinó que al entrar a la célula, el DENV causa la reorganización del citoesqueleto de actina mediante Rac1 (Wang et al., 2010). Se sabe que la activación de Rac1 y Cdc42 que ocurre al unirse el virus, induce la formación de filopodios, los cuáles son esenciales para el establecimiento de la infección (Zamudio-Meza et al., 2009; Castillo-Alvarez et al., 2009). Descubrimientos como el anterior se han complementado tratando a las células con citocalasina D, previo a una infección, inhibiendo así la entrada del WNV a la célula (Lee & Ng, 2004). Por otro lado, los microtúbulos solo parecen estar involucrados en eventos tempranos mediante una de sus proteínas accesorias, la dinamina 2; esta participa en el proceso de endocitosis uniéndose a la proteína viral E (Merino-Gracia, García-Mayoral, & Rodríguez-Crespo, 2011; Shrivastava, Sripada, Kaur, Shah, & Cecilia, 2011). Todas estas observaciones parecen indicar que los microfilamentos, los microtúbulos y sus proteínas accesorias, aunque en diferente medida, están íntimamente involucradas en la entrada de los flavivirus a la célula.

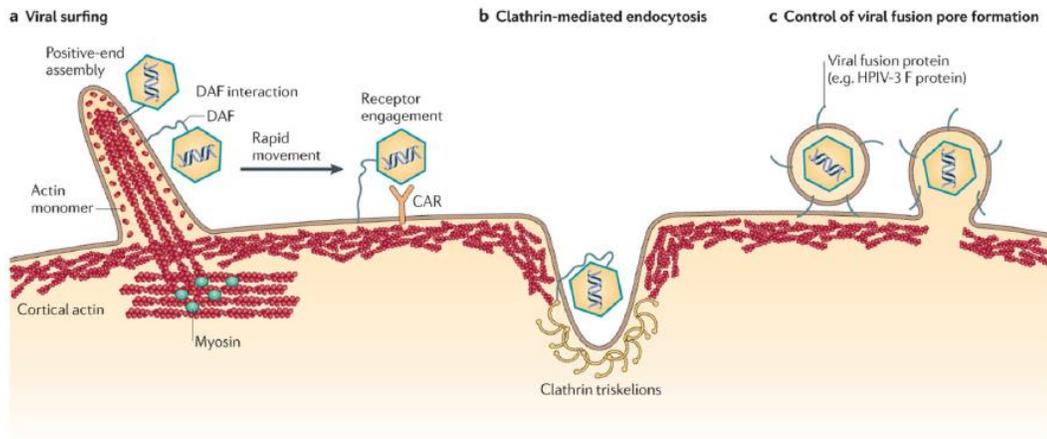


Figura 6. Endocitosis viral mediada por actina. Para entrar y salir de la célula, los virus deben de forzar la reorganización del anillo cortical de actina haciendo uso de sus proteínas accesorias. Tomado de: (Taylor et al., 2011)

Transporte transcitoplasmático

Para que los virus puedan obtener el control de la célula, necesitan distribuir sus elementos a todos los organelos, esto lo hacen utilizando el citoesqueleto de tubulina, que esta naturalmente conectado a una gran cantidad de localizaciones subcelulares (Figura 7). Se sabe que el complejo dineína transporta retrógradamente al virión de DENV en etapas iniciales de la infección y además se ha encontrado asociada en la región perinuclear con la proteína viral E (Shrivastava et al., 2011). La proteína α -tubulina interactúa con la recién sintetizada proteína E a las 8hpi y se cree que asiste en el ensamblaje del virión (Chee & AbuBakar, 2004). Hasta la fecha solamente se le han asignado dos roles a los filamentos intermedios en la infección por DENV y ambos son dependientes de la proteína vimentina, la cual colocaliza con varios antígenos del DENV2 y se cree que forma una especie de caja, dentro de la cual los viriones son ensamblados (Chen et al., 2008); además, esta proteína interactúa con NS4A, favoreciendo la replicación del virus (Teo & Chu, 2014).

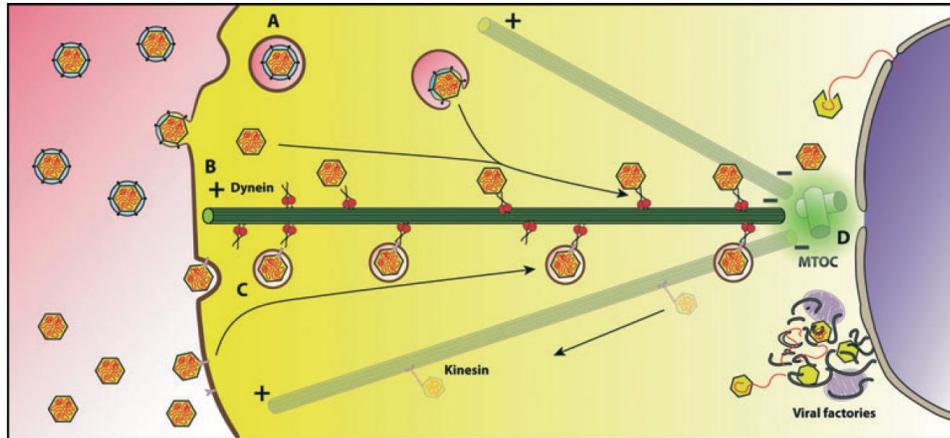


Figura 7. Usurpación de los microtúbulos por la infección viral.

Para distribuir sus elementos, los virus hacen uso de los microtúbulos y sus proteínas accesorias. Tomado de: (Merino-Gracia et al., 2011)

Egreso del virus de las células

Se sabe que el DENV se asocia con la miosina 2 y al alterarse esta relación, se disminuye la cantidad de virus secretados (Zamudio-Meza et al., 2009). Por otro lado, la actina de 43 kDa asiste en el egreso del DENV al unirse a la proteína E (Yang et al., 2013).

Sin embargo, aunque los diversos estudios realizados con flavivirus han dejado en evidencia que éstos utilizan el citoesqueleto de diversas maneras, especialmente al salir de la célula (Foo & Chee, 2015), queda aún mucho por conocer sobre la participación del citoesqueleto en el ciclo replicativo de los flavivirus, por lo que son necesarios más estudios en el área.

Como se mostró en los párrafos anteriores, la interacción flavivirus-citoesqueleto ha sido más estudiada en células de vertebrado que en células de mosquito. Es por ello que se hace necesario saber si estos eventos ocurren de manera similar en el vector, ya que este constituye la mitad del ambiente al que los flavivirus se someten; además, representan una oportunidad para desarrollar estrategias que permitan su control, al obtener más información acerca de los sistemas citoesqueléticos susceptibles a la infección.

A pesar de la importancia que conlleva para la replicación del virus y para la patogénesis de la enfermedad en humanos, la secreción de NS1 por parte de las células infectadas, son muchos los aspectos de este proceso que aún se desconocen, especialmente en células de mosquito. Entre otros, es necesario conocer mejor la participación del citoesqueleto y de otras proteínas celulares en dichos procesos, las rutas que NS1 utiliza para alcanzar la membrana celular o los mecanismos que la regulan dicho tránsito. Tratando de responder estas y otras interrogantes, se buscó identificar el interactoma de NS1 en la línea celular de *A. albopictus* C6/36, utilizando un sistema de biotilación por proximidad (Caraballo y Ludert, resultados no publicados). El análisis del interactoma, sugiere que en células de mosquito NS1 interactúa con elementos del citoesqueleto de actina y tubulina, así como con algunas de las proteínas accesorias motoras del citoesqueleto. Entre las proteínas accesorias de tubulina, en el interactoma se destacaron la cadena pesada de la dineína 1(DYNC1H1), la cadena ligera de la kinesina 1(KLC1); y entre las proteínas accesorias del citoesqueleto de actina, destacó la miosina no convencional 1C (MYO1C). (Figura 8) (Caraballo & Ludert; datos no publicados).

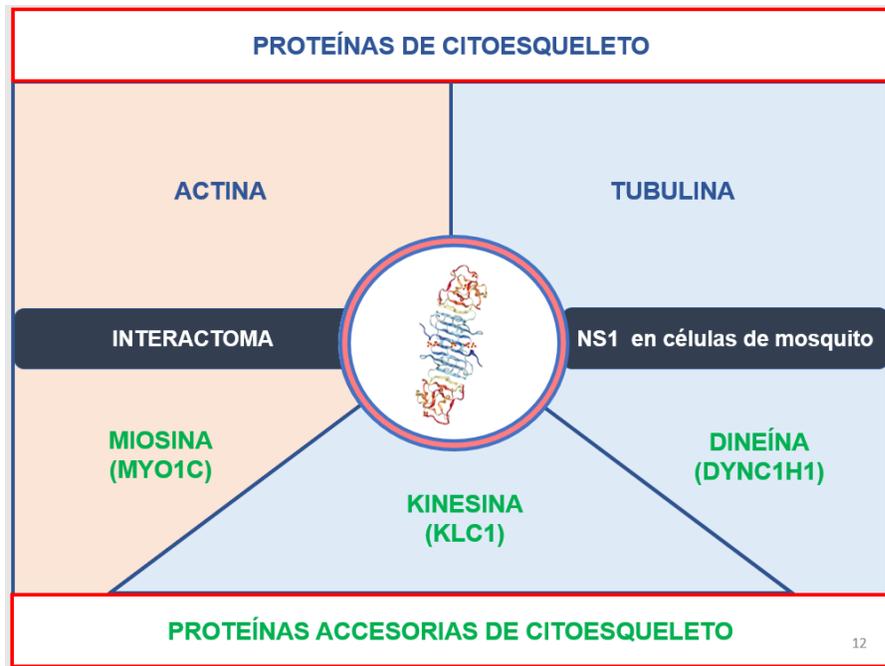


Figura 8. Proteínas asociadas al transporte transcitoplasmico encontradas en interactoma de NS1 en células de mosquito. Se encontraron proteínas asociadas a los microfilamentos como la miosina 1C, y proteínas asociadas a los microtúbulos, tales como la cadena pesada de la dineína 1 (DYNC1H1) y la cadena ligera de la kinesina 1 (KLC1).

Las proteínas motoras están involucradas en el transporte de diversos cargos a través del medio intracelular, utilizando el citoesqueleto de actina (miosinas no convencionales) y tubulina (dineína y kinesina) para este propósito. Estas proteínas adquirieron la capacidad de desplazarse a través del intercambio de nucleótidos trifosfato, el cuál ocasiona cambios conformacionales que se traducen como variaciones alternas en la afinidad que tienen con la actina y tubulina respectivamente, permitiendo así su traslado sobre el citoesqueleto de manera coordinada (Kolomeisky, 2013b; Vale, 2003). El papel que la dineína y la kinesina tienen en el transporte de cargos a través de organelos y a la membrana celular están bien documentados (Bhabha et al., 2016; Hirokawa et al., 2009). Además se ha reportado su interacción con proteínas

virales (Radtke, Döhner, & Sodeik, 2006; Reck-Peterson et al., 2018), sugiriendo que están involucradas en el ciclo de vida de algunos virus. Para las miosinas no convencionales se ha reportado que éstas están involucradas en el transporte y secreción coordinada de elementos propios y virales a través de la actina cortical (Gutiérrez, 2012; Radtke et al., 2006; Ward, 2011). Tomando en cuenta los resultados del interactoma de NS1 en células de mosquito y los antecedentes de la participación del citoesqueleto y de algunas de sus proteínas accesorias en la replicación de flavivirus y otros virus, resultó de nuestro interés profundizar sobre el estudio de estas estructuras y proteínas durante la replicación de DENV en células de mosquito.

JUSTIFICACIÓN

En células de mosquito, la proteína NS1 del DENV se secreta por una vía no clásica unida al complejo chaperón de caveolina. Sin embargo, los factores del huésped que participan en el tráfico de la NS1 unida al complejo chaperón de caveolina desde el ER hasta el medio extracelular se desconocen. Dado que estudios previos de proteómica en células C6/36 sugieren la interacción de NS1 con el citoesqueleto de actina y tubulina, junto con las proteínas motoras MYO1C, DYNC1H1 y KLC1, se hace necesario corroborar estas interacciones y conocer si estos sistemas de transporte efectivamente participan en la secreción de NS1 en células de mosquito.

HIPÓTESIS

El citoesqueleto de actina y tubulina en coordinación con las proteínas motoras MYO1C, DYNC1H1 y KLC1 participan en el transporte hacia el medio extracelular de la proteína NS1 de DENV en células de mosquito.

OBJETIVOS

General

Evaluar la participación del citoesqueleto de tubulina, así como de las proteínas motoras MYO1C, DYNC1H1 y KLC1 en el transporte y secreción de NS1.

Particulares

- Estudiar el efecto de fármacos inhibidores de la polimerización de tubulina en el transporte y secreción de NS1 de DENV.
- Evaluar la posible interacción de la NS1 de DENV y las proteínas motoras accesorias del citoesqueleto MYO1C, DYNC1H1 y KLC1 en células de mosquito infectadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

Como líneas celulares de mosquito, se usaron las líneas C6/36 y Aag2 provenientes de tejido larvario de *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti*, respectivamente y la línea BHK-21 proveniente de riñón de hámster. Todas ellas se cultivaron en MEM suplementado con suero fetal bovino al 5%, en una atmósfera de 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C para las células BHK-21 y a 28°C para las células de mosquito.

2. Virus

Se utilizó el serotipo 2 de DENV, (donada por el InDRE), el cual fue titulado en células Vero-E6 mediante la técnica de unidades formadoras de foco. La cepa del virus Zika utilizada en este estudio es la cepa mexicana del genotipo asiático (ZIKV AS-MEX).

3. Ensayos de viabilidad celular

Para determinar las concentraciones efectivas pero no citotóxicas de colchicina (Merck, C9754-100MG) que estabilizan el citoesqueleto de tubulina, se realizaron previamente ensayos de viabilidad celular usando concentraciones crecientes del fármaco en células C6/36 y Aag2 sembradas en placas de 96 pozos. Se usaron concentraciones de 50, 100, 200, 400, 800, 1600 y 3200 uM. Como control se utilizó DMSO a la concentración utilizada para diluir el fármaco. Se dejó en contacto con las células durante 24 h y posteriormente se midió la viabilidad celular mediante un ensayo colorimétrico de reducción de la sal de tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio)(MTS, CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez transcurridas 24 h de exposición de las monocapas al fármaco, se retiró el medio de los pozos y se añadieron 50 ul de medio más 10 ul de MTS por pozo y se dejaron incubando por 1 h a 37°C en 5% de CO₂. Por último, la densidad óptica a una absorbancia de 490 nm se midió mediante un lector de placas de ELISA . Los resultados

se expresaron como porcentaje de células vivas, tomando como 100% de viabilidad los valores obtenidos con células tratadas solo con DMSO.

Además de los ensayos con MTT, también se realizaron ensayos de viabilidad celular en células C6/36 sembradas en placas de 96 pozos, usando SYTOX, el cual es un compuesto que solo penetra en las células muertas o fijadas y permeabilizadas, y emite fluorescencia al unirse al ADN de la célula. Se usaron concentraciones de 50 y 400 μM , como control se usó tritón al 0.01%, el cuál al ser un detergente causó poros en la membrana permitiendo la entrada del SYTOX (S7020; Thermo Fisher) a la célula. El fármaco se dejó en contacto con las células durante 24 h y posteriormente se midió la viabilidad celular haciendo uso de un lector de placas capaz de medir la fluorescencia emitida por las células con SYTOX en su interior a una longitud de onda de 504/523 nm. Los resultados se expresaron como intensidad de fluorescencia, siendo las células no viables las que emiten dicha señal.

4. Evaluación del efecto de colchicina

Monocapas de células C6/36 sembradas en placas de 24 pozos fueron tratadas con el fármaco estabilizador de citoesqueleto, usando las concentraciones no letales obtenidas en los ensayos de viabilidad y se dejaron incubando durante 24 h a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente las células se fijaron con formaldehído (PFA, PQF, 10850) al 4% durante 10 m para después ser permeabilizadas con Tritón 0.2% durante 10 m. Los microtúbulos se marcaron con el anticuerpo primario de conejo betaTubulin antibody (GeneTex, # catalogo) en solución de bloqueo al 10% durante la noche. Para visualizar el anticuerpo de tubulina se utilizó un anticuerpo secundario marcado con Alexa fluor 647 (Abcam, 150135), durante 1h a 37°C . El núcleo se tiñó con DAPI (Sigma-Aldrich, D9542) durante 5 minutos. Entre cada uno de los pasos se lavó 3 veces con PBS Tween 0.1%. Las células se visualizaron en un microscopio confocal marca Zeiss, modelo LSM 700.

5. Secreción de NS1 y partículas infecciosas en los sobrenadantes de células tratadas con colchicina.

Las células C6/36 se sembraron en placas de 96 pozos, las cuales se infectaron con DENV-2 o con ZIKV AS-MEX a una MOI=3 y se incubaron durante dos h a 37°C y 5% de CO₂. Una vez terminado el tiempo de incubación se retiró el medio de los pozos y se añadió una solución de MEM con diferentes concentraciones de colchicina. Se usaron concentraciones no citotóxicas (derivadas de los ensayos de viabilidad) y tratamientos durante 24 h a 37°C. Una vez concluido el tiempo de incubación, se retiraron los sobrenadantes y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Los niveles de NS1 en el sobrenadante se determinaron por ELISA y se calculó el título de viriones secretados por ensayos de focos.

6. Ensayo de unidades formadoras de foco (UFF) para la determinación del título viral

En una placa de 96 pozos se sembraron células BHK-21, las cuáles se infectaron con los sobrenadantes obtenidos de los tratamientos con colchicina; para este propósito se hicieron 6 diluciones limitantes en base 10 para cada uno de los sobrenadantes y se incubaron durante 48 h. Una vez concluido este tiempo, se retiró el medio de los pozos y se fijaron con 100 ul de PFA al 4% durante 15 m. A continuación, las células se lavaron con PBS 1X para después agregarles 50 ul de metanol a -20°C durante 15 m. Se retiró el metanol de los pozos y se lavó con PBS-Tween 0.1%. Una vez lavadas las monocapas, se añadieron 50 ul de una solución con PBS-Tween y suero fetal bovino 10% con el anticuerpo monoclonal pan-flavivirus 4G2, el cual es capaz de reconocer tanto la proteína E de DENV como de ZIKV, a una dilución 1:500, como anticuerpo primario. La placa se dejó incubando durante la noche a 4°C. Los pozos se lavaron con PBS-Tween 0.1% y se añadió una solución de PBS-Tween y suero fetal bovino 10% con anticuerpos secundarios a una dilución de 1:5000 durante 1 h a 37°C; A continuación se preparó una solución de diamino-benzidina (DAB) (Peroxidase Substrate Kit;Vector) siguiendo las instrucciones del fabricante y se añadieron 50 ul de solución a cada pozo.

Finalmente, la placa se dejó incubado a 37°C durante 20 m hasta que las células adquirieron un color café oscuro, cuando la reacción fue detenida añadiendo agua destilada a los pozos.

7. Medición de los niveles de NS1 secretados por ensayos de ELISA.

Se recubrió una placa de ELISA de 96 pozos (Nunc-Inmuno, Sigma-Aldrich) con 200 ng de anticuerpo monoclonal anti-NS1 7E11 purificado y diluido en tampón de carbonato (0.05 M, pH 9.6) durante toda la noche a 4°C. Para disminuir la unión no específica se bloquearon todos los pozos incubando con 100ul de tampón de bloqueo (PBS con suero fetal bovino al 10%) durante 1 hora a 37°C. A continuación, se agregaron 50 ul de sobrenadante a cada pozo y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Posteriormente se añadieron 50ul de anti-NS1 7E11 conjugado con estreptavidina conjugada con HRP, diluida 1:10,000 en PBS y se incubaron durante 1 h a 37°C. El Mab 7E11 es capaz de reconocer igualmente la NS1 de DENV como de ZIKV. Entre cada paso, los pozos se lavaron 3 veces con una solución de PBS Tween 20 al 0.01%. La reacción se desarrolló añadiendo 160 ul de TMB (Sigma-Aldrich) durante 15 m, y se detuvo con la adición de 50 ul de H₂SO₄ 2M. Para terminar, la placa se analizó en un lector de placas de ELISA a 450 nm. Los resultados se expresaron en porcentaje, tomando como 100% la cantidad de NS1 secretada en ausencia de las drogas.

8. Ensayos de co-localización entre la proteína NS1 de DENV y la proteína motora DYNC1H1 en células de mosquito.

Se sembraron células Aag2 y C6/36 sobre laminillas en placas de 24 pozos y se infectaron con DENV-2 a una MOI=3. Después de 24 h se fijaron con PFA al 4% durante 10 m para después ser permeabilizadas con Tritón 0.2% durante 10 m. Para marcar las proteínas motoras se utilizaron los anticuerpos primarios producidos en conejo anti-KLC1 [N2C2], (Internal, GeneTex), anti-Miosina 1C (GeneTex) y un anticuerpo anti-dineína (donado por el Dr. Edgar Morales-Ríos del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV). Para marcar la proteína viral NS1 se utilizó como anticuerpo primario el monoclonal de ratón 7E11

(donado por el Dr. Henry Puerta-Guardo de la Universidad Autónoma de Yucatán). Todos los anticuerpos primarios se utilizaron diluidos en solución de bloqueo al 10% y se incubaron a 37°C, durante toda la noche. Posteriormente, se añadieron los anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor 488 (Abcam) y Alexa fluor 647 (Abcam) durante 1h a 37°C. El núcleo se tiñó con DAPI (Sigma-Aldrich) durante 5 m. Entre cada uno de los pasos, las células fueron lavados 3 veces con PBS Tween 0.1%. Las laminillas se montaron en un portaobjetos con medio de montaje y DAPI (Sigma-Aldrich), para visualizarse en un microscopio confocal Zeiss, modelo LSM 700. La co-localización entre las proteínas de interés se determinó con al menos 10 células haciendo uso de los plugin Spot Detector y Colocalization Studio y se cuantificó mediante el coeficiente de correlación de Pearson en el software Icy.

9. Determinación de la interacción de las proteínas motoras MYO1C, DYNC1H1 y KLC1 con NS1 de DENV mediante ensayos de ligación por proximidad

Para determinar si las proteínas motoras interactúan con NS1, se utilizó el kit Duolink PLA (Sigma –Aldrich, # catalogo) en células de mosquito infectadas con DENV-2 a una MOI=3 y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, después de 18 h de infección, las células se fijaron y permeabilizaron con metanol y se incubaron con solución de bloqueo durante 1 h. Seguidamente, las monocapas se incubaron con los 2 anticuerpos primarios simultáneamente, uno dirigido contra NS1, producido en ratón y el otro contra alguna de las proteínas motoras, todos producidos en conejo, duante toda la noche. Las sondas que detectan los anticuerpos primarios de ratón y conejo se diluyeron en solución de bloqueo 1:5 y se agregaron a las laminillas para dejarse incubando 1 h a 37°C en una cámara húmeda. Si la distancia entre las sondas es menor a 40 nm se genera una señal de isotiocianato de fluoresceína, lo cual indica que hay interacción entre las dos proteínas. Las sondas de PLA que no se unieron a sus blancos se removieron lavando con buffer A (10 mM Tris-HCl,pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween

20). Para la hibridación de las dos sondas se usó la solución stock de hibridación de Duolink en dilución 1:5 y se incubó en una cámara húmeda a 37°C durante 15 m. Las muestras se incubaron en la solución stock de ligación de Duolink en dilución 1:5 junto con la ligasa de Duolink en dilución 1:40 durante 90 m a 37°C. La detección se realizó con la solución stock del kit de Duolink far red en dilución 1:5, la cual se dejó incubando 1 h a 37°C, para finalmente lavarse con buffer B (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 100 mM NaCl). Las laminillas se montaron *in situ* con medio de montaje y DAPI (Sigma-Aldrich), y se visualizaron en un microscopio confocal LSM 700. La señal de PLA se determinó con al menos 10 células en proyección máxima usando el plugin Spot Detector en el software Icy y los resultados se expresaron como puntos luminosos por célula. Como controles negativos se usaron células infectadas, pero omitiendo el anticuerpo primario contra NS1, así como células no infectadas, tratadas con ambos anticuerpos primarios.

10. Análisis estadístico

Los valores de todos los ensayos se expresaron como media \pm error estándar de tres experimentos independientes, cada uno por triplicado. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software GraphPad Prism versión 6.01 (Las pruebas estadísticas realizadas se indican en los pies de figuras en a sección de resultados).

RESULTADOS

1. Determinación de las concentraciones no letales de colchicina en células de mosquito.

La colchicina al ser un fármaco estabilizador del citoesqueleto de tubulina puede ser citotóxica en ciertas concentraciones, dependiendo de la línea celular. Es por eso que los primeros experimentos realizados consistieron en exponer a la línea celular de mosquito C6/36 a diferentes concentraciones de estos fármacos y evaluar la citotoxicidad de las distintas concentraciones usadas mediante dos ensayos de viabilidad diferentes; MTS y SYTOX.

Para colchicina, se usaron concentraciones de 50, 100, 200, 400, 800, 1600 y 3200 μM . Los resultados obtenidos con el ensayo de MTS sugieren que solo la concentración de 3200 μM resultó citotóxica para las células, con una viabilidad de poco más del 50% con relación al control (Figura 9A). Curiosamente, en las concentraciones no letales se observó un efecto que sugiere que la viabilidad de las células aumenta, ya que se obtuvieron valores por encima del control. Para descartar un posible artefacto del ensayo basado en la reducción del MTS, se escogieron dos concentraciones del fármaco y se evaluaron mediante el ensayo de SYTOX, cuyo principio no se basa en determinar la integridad de la membrana plasmática, y no la actividad metabólica de la célula.

Los resultados obtenidos con el ensayo de SYTOX y las concentraciones evaluadas de colchicina (50 y 400 μM) demuestran que dichas concentraciones no son letales para la monocapa (Figura 9B), y por lo tanto, se decidió utilizar estas concentraciones para los experimentos futuros.

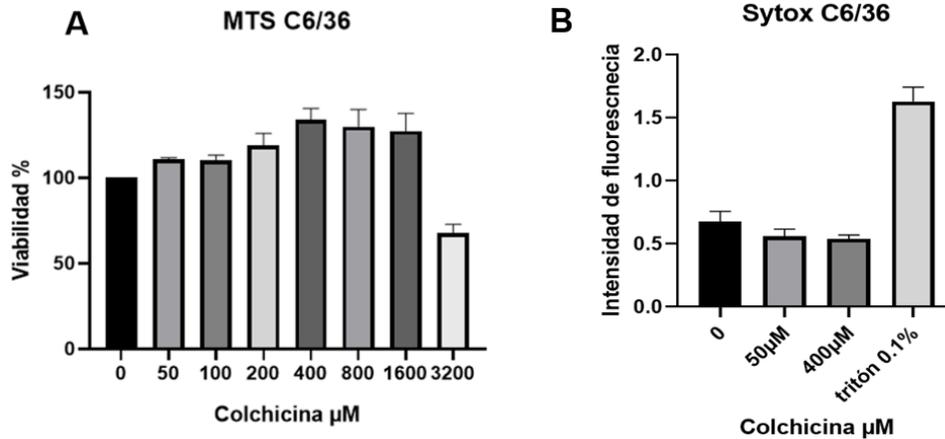


Figura 9. Ensayos de viabilidad con fármacos estabilizadores de citoesqueleto en células de mosquito. A y B) Viabilidad de células C6/36 tratadas con concentraciones crecientes de colchicina. Los datos son la media de 3 experimentos independientes \pm error estándar.

2. Efecto de las concentraciones no letales de colchicina sobre el citoesqueleto de células de mosquito.

Para determinar que la colchicina en las concentraciones seleccionadas tuviera el efecto estabilizador de citoesqueleto esperado en las células de mosquito, se evaluó mediante microscopía de epifluorescencia el efecto que dichos fármacos tienen sobre el citoesqueleto a las concentraciones elegidas.

En las células C6/36 no tratadas, se observó la marca del citoesqueleto de tubulina distribuida uniformemente en todo el citoplasma de la células (Figura 10A); en contraste, en las células tratadas a las concentraciones de 50 y 400 μM de colchicina se observó que los microtúbulos no se extendían sobre todo el citoplasma de la célula como ocurre en el control, sino más bien se observan replegados alrededor del núcleo, sugiriendo que el tratamiento no permite la correcta polimerización de los microtúbulos (Figura 9 B y C). Es importante resaltar que, si bien la intensidad de la fluorescencia parece disminuir a la mayor concentración de colchicina utilizada, no se observaron diferencias en el patrón de marca de los microtúbulos entre los tratamientos, lo cual sugiere

que con la concentración de 50 μM ya se alcanza todo el daño posible al citoesqueleto.

Con los datos obtenidos, se puede concluir que las concentraciones seleccionadas de colchicina ejercen su efecto estabilizador sobre el citoesqueleto sin ser letales para las células; por lo tanto, se decidió continuar el trabajo con las concentraciones antes mencionadas.

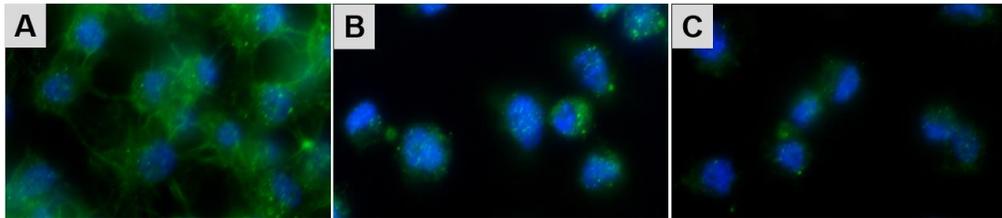


Figura 10. Efecto de colchicina en células de mosquito. A) Células control usadas para evaluar el efecto de la colchicina sobre los microtúbulos de células C6/36. B) Células de mosquito sometidas 24 h a una concentración de 50 μM de colchicina. C) Células de mosquito sometidas 24 h a una concentración de 400 μM de colchicina. Las se analizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia (imágenes Nikon Eclipse Ti,100X).

3. Efecto de la colchicina sobre la secreción de la proteína NS1 en células de mosquito infectadas con DENV y ZIKV.

Para evaluar la participación del citoesqueleto en la secreción de NS1 en células de mosquito, células C6/36 infectadas con DENV a una MOI:3 fueron tratadas por 24 h con colchicina a las concentraciones evaluadas, y a ese tiempo post-infección, los niveles de NS1 presentes en los sobrenadantes evaluados por ELISA (Figura 10A).

El tratamiento con colchicina a concentraciones de 50 y 400 μM redujo la secreción del NS1 en más de un 50%, en comparación con el control sin tratamientos (Figura 11). Aunque la concentración de 400 μM es 8 veces mayor que la de 50 μM , esta no parece inhibir la secreción de la proteína viral más allá del umbral del 50%. La falta de un efecto dosis-respuesta, podría deberse a que la colchicina en concentración de 50 μM ya es suficiente para

inhibir la polimerización de los microtúbulos de manera general. Este resultado es consistente con el mostrado en la Figura 10, en donde a pesar del aumento en la concentración de colchicina, el patrón celular observado para tubulina no parece tener diferencias evidentes con la señal emitida por las células tratadas con la concentración menor.

Para evaluar si el efecto de la colchicina sobre la secreción de NS1 era o no exclusivo para DENV, también se realizaron experimentos utilizando otro flavivirus, el ZIKV. La NS1 del virus del ZIKV y de DENV, tanto en su forma dimérica como hexamérica, presentan estructuras muy similares (Freire et al., 2017); trabajos previos de nuestro laboratorio sugieren que esta proteína es secretada de células de insecto siguiendo rutas no convencionales similares a las utilizadas por la NS1 de dengue (Ramirez & Ludert, 2019). En células C6/36 infectadas con ZIKV a una MOI:3, los tratamientos con concentraciones de 50 y 400 μ M durante 24 h, redujeron en un 40% aproximadamente la secreción del NS1, en comparación con el control sin tratamiento; además, se observó el mismo efecto que en los ensayos con DENV, en donde a pesar del aumento en concentración de colchicina la secreción de NS1 no parece disminuir (Figura 11B).

La disminución significativa observada en la secreción de NS1 de DENV y ZIKV en las células tratadas con concentraciones no-tóxicas, pero efectivas de colchicina, sugieren fuertemente que el citoesqueleto de tubulina participa en el tráfico y la secreción de NS1 desde el ER hasta el medio extracelular.

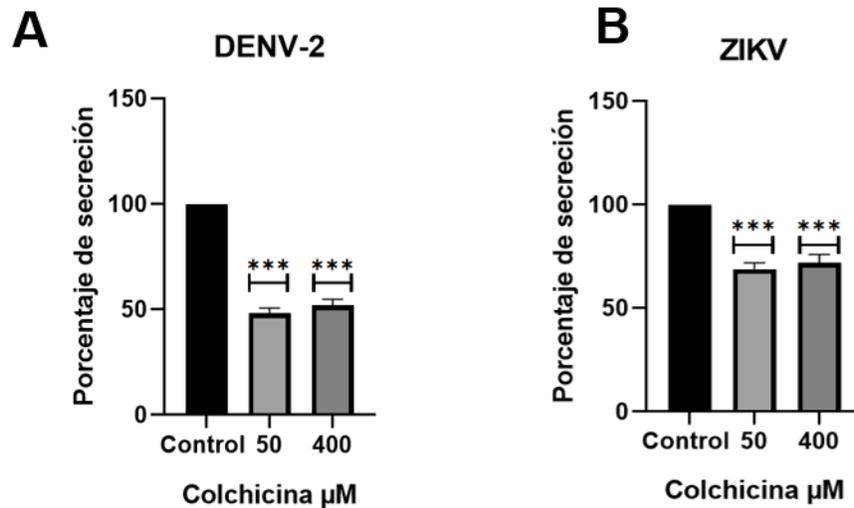


Figura 11. Efecto de fármacos estabilizadores de citoesqueleto de tubulina sobre la secreción de la proteína NS1 en células de mosquito. A) Secreción de la proteína NS1 de DENV-2 (A) y ZIKV (B) en células de mosquito tratadas por 24 h, con dos diferentes concentraciones de colchicina. Los experimentos se realizaron por triplicado, y las barras representan medias \pm error estándar. Los datos se evaluaron mediante la prueba de 2 vías ANOVA y las diferencias significativas en comparación con el grupo de tratamiento se indican con asteriscos. ($P \leq 0,05$).

4. Efecto de colchicina sobre la secreción de viriones en células de mosquito infectadas con DENV y ZIKV.

Trabajos previos, indican que tanto en células de vertebrados como en células de mosquito, la secreción de los viriones de DENV, ocurre a través de la ruta clásica de secreción, vía el complejo trans-Golgi (Rosales y Ludert, 2018). Sin embargo, no existe evidencia clara sobre si el citoesqueleto de tubulina se requiere para la secreción de los viriones de virus miembros del género *Flavivirus*. Para determinar si la secreción de viriones de DENV y ZIKV depende del citoesqueleto de tubulina, las células C6/36 infectadas se trataron

con colchicina como se describe en la sección de métodos, y se determinó la cantidad de viriones secretados al sobrenadante (progenie viral). Los resultados obtenidos para DENV mostraron reducciones de 3 logaritmos en las células tratadas con 50 y 400 μM de colchicina, (Figura 12A), mientras que para ZIKV (Figura 12B) se observaron reducciones de 2 y 3 logaritmos respectivamente, para las concentraciones de 50 y 400 μM . Estas son reducciones superiores al 99% para ambos virus a cualquiera de las concentraciones utilizadas, y mucho más altas que las observadas para NS1 (Figura 11), lo cual indica que la secreción de viriones de DENV y ZIKV en células de mosquito depende fuertemente del citoesqueleto de tubulina.

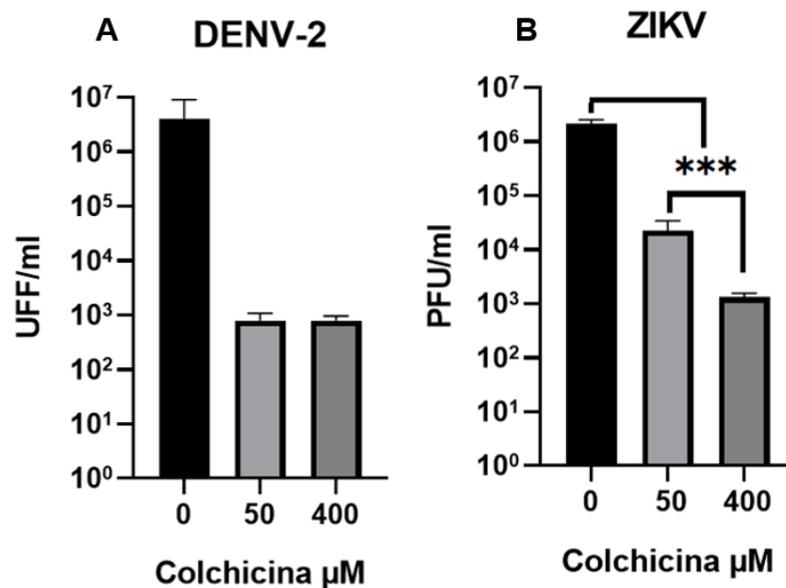


Figura 12. Efecto de fármacos estabilizadores de citoesqueleto de tubulina sobre la secreción de viriones en células de mosquito. Progenie viral de DENV-2 en células tratadas con dos diferentes concentraciones de colchicina. Los experimentos se realizaron por triplicado, y las barras representan medias \pm error estándar. Los datos se evaluaron

mediante la prueba de 2 vías ANOVA y las diferencias significativas en comparación con el grupo de tratamiento se indican con * ($P \leq 0,05$).

5. Colocalización e interacción entre las proteínas MYO1C, DYNC1H1 y KLC1 y la proteína viral NS1 del DENV en células de mosquito.

Dado que existen datos que sugieren que en el interactoma de NS1 se encuentran varias proteínas accesorias (Caraballo & Ludert; datos no publicados), como un ensayo preliminar para corroborar los datos de proteómica, se determinó si en células de mosquito infectadas, NS1 mostraba colocalización con la proteína motora accesoria, DYNCH1. Los resultados mostrados en la Figura 13 muestran una colocalización positiva entre NS1 y DYNCH1 en células fijadas a las 24 hpi, indicando que el complejo dineína y NS1 están en el mismo vecindario molecular.

Para corroborar los resultados de los ensayos de colocalización de NS1 con DYNC1H1 y evaluar las otras dos proteínas motoras identificadas en el interactoma de NS1, MYO1C y KLC1, se realizaron ensayos de ligación por proximidad (PPL) en células de mosquito infectadas. Estos ensayos están basados en el uso de anticuerpos primarios contra las proteínas de interés y en la distancia que existe entre dos proteínas, si dichas proteínas están a una distancia menor o igual a 40 nm, el uso de anticuerpos secundarios acoplados a sondas y una amplificación enzimática, termina produciendo una fluorescencia en rojo. Los resultados de la Figura 14, muestran que en células de mosquito infectadas efectivamente existe interacción directa entre la proteína NS1 y la proteínas accesorias al citoesqueleto de tubulina, la DYNC1H1 (panel C) y la proteína KLC1 (panel D), así como también a la proteína accesoria al citoesqueleto de actina MYO1C (panel E). En los 3 casos los puntos fluorescentes se ubican principalmente en el citoplasma de la célula, indicando que allí ocurre la interacción entre NS1 y las proteínas motoras, como era de esperarse. La ausencia de marca en los controles negativos (paneles A y B) sugiere que la señal obtenida entre NS1 y las

proteínas motoras es específica. Estos resultados confirman los resultados obtenidos por colocalización entre NS1 y DYNC1H1 (Figura 13), así como los obtenidos para el interactoma de NS1 en células C6/36 (Carballo y Ludert, resultados no publicados).

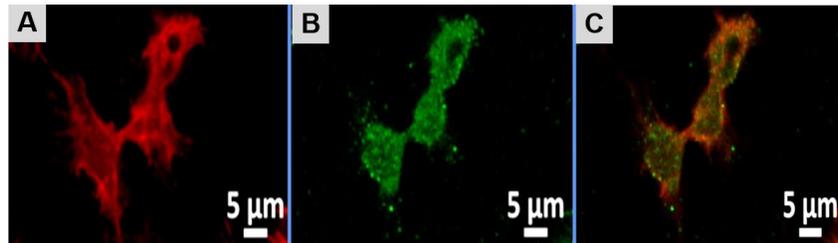


Figura 13. Colocalización entre la proteína DYNC1H1 y la proteína viral NS1 del DENV-2 en células de mosquito. A) Marca de la proteína DYNC1H1 en células infectadas con DENV-2 a una MOI:3 durante 24 h. **B)** Marca de la proteína viral NS1 en células infectadas con DENV-2 a una MOI:3 durante 24 . **C)** Colocalización entre las proteínas DYNC1H1 y NS1 del DENV-2 con un coeficiente de Pearson 0.575. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal LSM 700. La co-localización entre las proteínas de interés se determinó en al menos 10 células haciendo uso de los plugin Spot Detector y Colocalization Studio y se cuantificó mediante el coeficiente de correlación de Pearson con el software Icy.

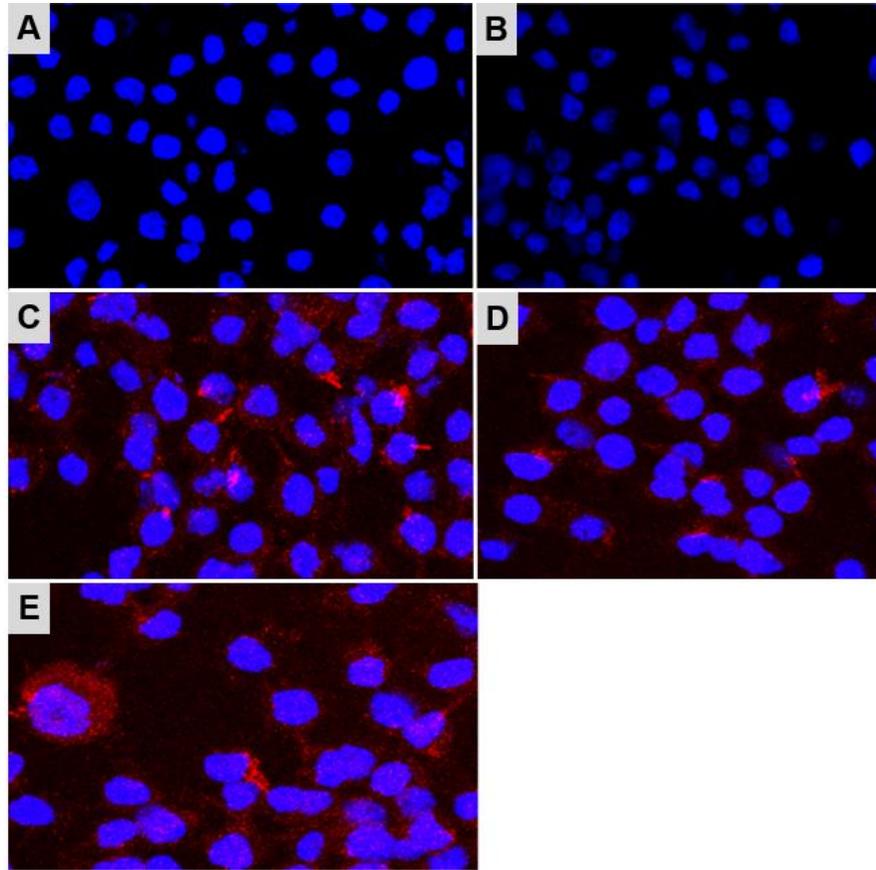


Figura 14

Interacción entre las proteínas DYNC1H1, KLC1 y MYO1C, y la proteína viral NS1 del DENV-2 en células de mosquito. A) Células mock. **B)** Control técnico en células infectadas con DENV a una MOI:3 durante 24 h. **C)** Interacción entre la proteína DYNC1H1 y la proteína viral NS1 de DENV. **D)** Interacción entre la proteína KLC1 y la proteína viral NS1 de DENV. **E)** Interacción entre la proteína MYO1C y la proteína viral NS1 de DENV-2. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal LSM 700. Todas las imágenes fueron tomadas a una distancia de 40X.

DISCUSIÓN

Las infecciones con DENV y con ZIKV conllevan a la liberación de viriones maduros a través de un proceso de secreción, que no requiere de lisis celular. Además, a partir de las células infectadas, no solo se secretan viriones, sino también la proteína NS1, la cual en su forma soluble participa en varios mecanismos de la patogénesis del dengue y del Zika. La secreción tanto de viriones como de NS1 ocurre de manera eficiente tanto en células de vertebrados como de mosquitos. Datos previos de nuestro laboratorio indican que, si bien la secreción de viriones ocurre por vías similares en las células de vertebrados y de mosquitos, las rutas seguidas por NS1 parecen diferir significativamente en ambos tipos celulares. El citoesqueleto celular, ya sea en su componente de tubulina o de actina, es un organelo clave en el transporte de proteínas cargo que van a ser secretadas por las células. Es por ello que en este trabajo buscamos obtener evidencia de la participación de dicho organelo en el ciclo de replicación de estos flavivirus, que son de tanta importancia para la salud pública. Para ello, se creó un modelo que permitió evaluar de manera general la influencia del sistema citoesquelético sobre el tráfico de la proteína NS1 y el virión tanto de DENV como ZIKV al medio extracelular, basado en el uso la toxina colchicina en células de mosquito, la cual se une a los extremos positivos de los microtúbulos, impidiendo así su polimerización (Borisy & Taylor, 1967). Además, se buscó obtener evidencia de interacción directa entre la proteína NS1 y algunas proteínas accesorias del citoesqueleto.

Se realizaron ensayos de viabilidad para determinar las concentraciones con las cuales las células C6/36 podrían ser tratada sin causar citotoxicidad. Ya que los ensayos MTS y SYTOX (Figura 9) indicaron que las concentraciones de 50 y 400 μM no afectaban la viabilidad de las células, se evaluó mediante microscopía de epifluorescencia si el mecanismo estabilizador de microtúbulos se mantenía en esas concentraciones (Figura 10) en donde se puede observar una disminución y cambio del patrón de fluorescencia

comparando con el control, lo cual indica una disminución en la polimerización de microtúbulos causada por la colchicina.

Al usar las concentraciones de 50 y 400 μM de colchicina sobre células infectadas con DENV y ZIKV se observó una disminución en la cantidad de proteína NS1 y de virus secretado (Figuras 11 y 12), lo cual sugiere que ambos procesos de secreción están mediados por microtubulos. La caída observada en la secreción de NS1 podría deberse a la desorganización de los microtúbulos por efecto de la colchicina y a la posibilidad de que la NS1 de estos flavivirus depende del sistema citoesquelético; por lo tanto al entorpecerse su tránsito la cantidad de NS1 que llega a la membrana para ser secretada disminuye. Como se mencionó con anterioridad, hasta la fecha se desconoce a fondo la manera en que la proteína NS1 transita por la célula de mosquito infectada, y esto incluye la manera en que se aproxima desde el RER a la membrana celular para después ser secretada. Un manera ampliamente utilizada por una gran cantidad de virus para movilizar las proteínas virales de manera anterógrada y retrograda es la usurpación del sistema de transporte citoesquelético (Miklavc & Frick, 2020; Taylor et al., 2011; Ward, 2011). Se sabe que NS1 en vertebrados sigue una vía de secreción convencional, utilizando las cisternas de aparato de Golgi, es decir no interactúa de manera prominente con el citoplasma; en contraste, en células de *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti* al ser infectada por estos flavivirus la proteína NS1 sigue una ruta de secreción no convencional (Ramirez & Ludert, 2019), dependiendo de sistemas que usen el citoplasma, así como las proteínas que éste alberga. El citoesqueleto de tubulina es el sistema dominante de transporte en el citoplasma y se sabe que los flavivirus como DENV o WNV, lo aprovechan junto con sus proteínas accesorias para secretar o movilizar sus proteínas, en células de vertebrado (Chu, 2002; Shrivastava et al., 2011). Los datos obtenidos a través de los ensayos de ELISA, sugieren que en células de mosquito infectadas con DENV y el ZIKV, los microtúbulos participan de forma muy importante el transporte de NS1 al medio extracelular.

Una observación interesante es la falta de efecto dosis respuesta y la inhibición parcial en la secreción, en los ensayos de ELISA para ambos virus y el ensayo de UFF para DENV-2 (Figura 11 y 12). Este fenómeno podría tener dos respuestas: las concentraciones seleccionadas, a pesar de ser dañinas para las células, no son citotóxicas, haciendo ver que la célula aún es capaz de usar los microtúbulos de manera mínima, por lo tanto estos virus aprovechan los remanentes del sistema citoesquelético; otra posibilidad sería la existencia de un sistema de transporte paralelo para NS1 dependiente de otras proteínas y/o elementos celulares, ya que aunque se aumente 8 veces la concentración de colchicina, NS1 continua siendo secretada.

La marcada disminución del título viral observada en los ensayos de UFF, superior al 99% (Figura 12), implica una fuerte dependencia a los microtúbulos por parte de DENV y ZIKV, para la secreción de los viriones maduros en células de mosquito. Estos resultados concuerdan con reportes previos que indican que virus como Herpes simplex y flavivirus tales como DENV-2 y WNV son capaces de usar los microtúbulos como vías de tráfico para secretar sus viriones (DuRaine, Todd W. Wisner, Paul Howard, 2018; Zamudio-Meza et al., 2009) y extienden estos resultados a células de mosquito.

Para detallar más la relación entre los microtúbulos y la infección por DENV se realizó un ensayo de colocalización entre una de sus proteínas accesorias (complejo dineína) y la proteína NS1 (Figura 13), el cuál resulto positivo. Es importante resaltar que las zonas de colocalización parecen estar confinadas al borde externo de la célula (zonas naranjas), lo cual es contradictorio a la localización normal del complejo dineína, ya que ésta es la encargada del transporte retrógrado (Schnapp & Reese, 1989). Una posible explicación para este resultado es que la interacción entre NS1 y DYNCH1 sea dinámica y vaya cambiando con el progreso de la infección. Para explorar esta posibilidad sería necesario hacer ensayos a diferentes tiempos para evaluar en el tiempo post infección el patrón de colocalización. Los resultados de colocalización fueron corroborados mediante ensayos de ligación por proximidad realizados sobre

las 2 proteínas motoras accesorias de los microtúbulos (DYNC1H1 y KLC1) y uno de los microfilamentos (MYO1C). Esto podría sugerir que durante la infección por DENV, el complejo dineína transporta retrógradamente a NS1, posiblemente distribuyéndola hacia distintos organelos desde el RE; mientras que el complejo kinesina la transporta anterogradamente, aproximándola al anillo cortical de actina, en donde NS1 sería transportada por MYO1C hacia la membrana. Existen estudios donde a MYO1C se le asigna la función de transportar cargos sobre los microfilamentos (Bond, Brandstaetter, Kendrick-Jones, & Buss, 2013) y ayudar en los pasos finales de la exocitosis de moléculas de carácter lipídico (Bond et al., 2011; McConnell & Tyska, 2010); MYO1C cuenta con una región denominada PH, la cuál es capaz de interactuar con la membrana y con lipoproteínas (Filigheddu et al., 2007; Lu, Li, Ye, & Zhang, 2015). La forma hexamérica de NS1 (Figura 3), es considerada una lipoproteína (Gutsche et al., 2011; Scaturro et al., 2015), lo cual hace el resultado de interacción entre NS1 y MYO1C sumamente interesante. Además, al ser MYO1C una proteína accesoria del citoesqueleto de actina, este resultado está también sugiriendo una posible participación de los microfilamentos y sus proteínas accesorias en el tráfico y la secreción de NS1.

Los resultados obtenidos en los ensayos de colocalización y PLA son consistentes con los ensayos de ELISA y de unidades formadoras de foco realizados en células tratadas con colchicina, y con otros estudios mencionados anteriormente, donde se observa interacción entre proteínas virales y proteínas motoras accesorias; lo cual parece indicar que DENV y probablemente ZIKV utilizan el transporte transcitoplasmático para cumplir con su ciclo de replicación, además de ser un factor de susceptibilidad clave en la patogenicidad del virus.

CONCLUSIONES

La secreción de la proteína NS1 y de los viriones del DENV y ZIKV depende del citoesqueleto de tubulina y dada la interacción que existe entre algunas de sus proteínas motoras accesorias, es posible que éstas sean utilizadas para movilizar elementos virales a través de la célula de mosquito, convirtiéndose en una pieza clave en el ciclo de vida de estos flavivirus.

PERSPECTIVAS

1. Evaluar la participación de los microfilamentos en los procesos de secreción de NS1 y de viriones maduros de células de mosquito. Ello permitiría conocer si la actina y sus proteínas accesorias son un factor de susceptibilidad a la infección por flavivirus, además permitiría elaborar un mecanismo detallado para el transporte de cargos virales por el citoesqueleto.
2. Determinar las regiones de interacción exactas entre las proteínas motoras accesorias y NS1. Ello permitiría realizar ensayos funcionales y por lo tanto se podrían generar estrategias para disminuir la infección por flavivirus en mosquito, permitiendo así un mejor control.

REFERENCIAS

- Aghamohammadzadeh, S., & Ayscough, K. R. (2009). Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis. *Nature Cell Biology*, 11(8), 1039–1042. <https://doi.org/10.1038/ncb1918>
- Ambrose, J. H., Sekaran, S. D., & Azizan, A. (2017). Dengue Virus NS1 Protein as a Diagnostic Marker: Commercially Available ELISA and Comparison to qRT-PCR and Serological Diagnostic Assays Currently Used by the State of Florida. *Journal of Tropical Medicine*, 2017, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2017/8072491>
- Bezanilla, M., Gladfelter, A. S., Kovar, D. R., & Lee, W. L. (2015). Cytoskeletal dynamics: A view from the membrane. *Journal of Cell Biology*, 209(3), 329–337. <https://doi.org/10.1083/jcb.201502062>
- Bhabha, G., Johnson, G. T., Schroeder, C. M., & Vale, R. D. (2016). How Dynein Moves Along Microtubules. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(1), 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.11.004>
- Bond, L. M., Brandstaetter, H., Kendrick-Jones, J., & Buss, F. (2013). Functional roles for myosin 1c in cellular signaling pathways. *Cellular Signalling*, 25(1), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.09.026>
- Bond, L. M., Brandstaetter, H., Sellers, J. R., Kendrick-Jones, J., & Buss, F. (2011). Myosin motor proteins are involved in the final stages of the secretory pathways. *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1115–1119. <https://doi.org/10.1042/BST0391115>
- Borisy, G. G., & Taylor, E. W. (1967). The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-3H to cellular protein. *The Journal of Cell Biology*, 34(2), 525–533. <https://doi.org/10.1083/jcb.34.2.525>
- Brouhard, G. J., & Rice, L. M. (2018). Microtubule dynamics: An interplay of biochemistry and mechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(7), 451–463. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0009-y>
- Chee, H. Y., & AbuBakar, S. (2004). Identification of a 48 kDa tubulin or tubulin-like C6/36 mosquito cells protein that binds dengue virus 2 using mass spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(1), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.124>
- Chen, W., Gao, N., Wang, J. L., Tian, Y. P., Chen, Z. T., & An, J. (2008). Vimentin is required for dengue virus serotype 2 infection but microtubules are not necessary for this process. *Archives of Virology*, 153(9), 1777–1781. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0183-x>
- Chu, J. J. H. (2002). Trafficking mechanism of West Nile (Sarafend) virus structural proteins. *Journal of Medical Virology*, 67(1), 127–136. <https://doi.org/10.1002/jmv.2201>
- Chu, J. J. H., & Ng, M. L. (2004). Infectious Entry of West Nile Virus Occurs

- through a Clathrin-Mediated Endocytic Pathway. *Journal of Virology*, 78(19), 10543–10555. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.19.10543-10555.2004>
- Colpitts, T. M., Cox, J., Nguyen, A., Feitosa, F., Krishnan, M. N., & Fikrig, E. (2011). Use of a tandem affinity purification assay to detect interactions between West Nile and dengue viral proteins and proteins of the mosquito vector. *Virology*, 417(1), 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.06.002>
- De La Cruz, E. M., & Ostap, E. M. (2004). Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(1), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.11.011>
- Diz-Muñoz, A., Fletcher, D. A., & Weiner, O. D. (2013). Use the force: Membrane tension as an organizer of cell shape and motility. *Trends in Cell Biology*, 23(2), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.09.006>
- Dumontet, C., Durán, G. E., Steger, K. A., Murphy, G. L., Sussman, H. H., & Sikic, B. I. (1996). Differential expression of tubulin isotypes during the cell cycle. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 35(1), 49–58. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(1996\)35:1<49::AID-CM4>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(1996)35:1<49::AID-CM4>3.0.CO;2-D)
- DuRaine, Todd W. Wisner, Paul Howard, D. C. J. (2018). Kinesin-1 Proteins KIF5A, -5B, and -5C Promote Anterograde Transport of Herpes Simplex Virus Enveloped Virions in Axons. *Journal of Virology*, 92(20), 1–16.
- Elshuber, S., Allison, S. L., Heinz, F. X., & Mandl, C. W. (2003). Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *Journal of General Virology*, 84(1), 183–191. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18723-0>
- Etienne-Manneville, S. (2018). Cytoplasmic Intermediate Filaments in Cell Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 34(1), 1–28. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062534>
- Filigheddu, N., Gnocchi, V. F., Coscia, M., Cappelli, M., Porporato, P. E., & Taulli, R. (2007). Santiago M. Di Pietro,* Juan M. Falco ´n-Pe ´rez,* Danie `le Tenza,† Subba R.G. Setty,‡ Michael S. Marks,‡ Grac ¸a Raposo,† and Esteban C. Dell’Angelica*. *Molecular Biology of the Cell*, 18(December), 986–994. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>
- Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F. A., & Deubel, V. (1999). Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of Virology*, 73(7), 6104–6110.
- Foo, K. Y., & Chee, H. Y. (2015). Interaction between Flavivirus and cytoskeleton during virus replication. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/427814>
- Fraisier, C., Camoin, L., Lim, S., Bakli, M., Belghazi, M., Fourquet, P., ... Almeras,

- L. (2013). Altered Protein Networks and Cellular Pathways in Severe West Nile Disease in Mice. *PLoS ONE*, 8(7).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068318>
- Freire, M. C. L. C., Pol-Fachin, L., Coêlho, D. F., Viana, I. F. T., Magalhães, T., Cordeiro, M. T., ... Lins, R. D. (2017). Mapping Putative B-Cell Zika Virus NS1 Epitopes Provides Molecular Basis for Anti-NS1 Antibody Discrimination between Zika and Dengue Viruses. *ACS Omega*, 2(7), 3913–3920.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00608>
- Gillespie, L. K., Hoenen, A., Morgan, G., & Mackenzie, J. M. (2010). The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex. *Journal of Virology*, 84(20), 10438–10447. <https://doi.org/10.1128/jvi.00986-10>
- Guilarde, A. O., Turchi, M. D., Jr., J. B. S., Feres, V. C. R., Rocha, B., Levi, J. E., ... Martelli, C. M. T. (2008). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever among Adults: Clinical Outcomes Related to Viremia, Serotypes, and Antibody Response. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(6), 817–824.
<https://doi.org/10.1086/528805>
- Gutiérrez, L. M. (2012). New Insights into the Role of the Cortical Cytoskeleton in Exocytosis from Neuroendocrine Cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 295, 109–137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394306-4.00009-5>
- Hidari, K. I. P. J., & Suzuki, T. (2011). Dengue virus receptor. *Tropical Medicine and Health*, 39(4 SUPPL.), 37–43. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S03>
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., & Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(10), 682–696. <https://doi.org/10.1038/nrm2774>
- Hirokawa, N., & Tanaka, Y. (2015). Kinesin superfamily proteins (KIFs): Various functions and their relevance for important phenomena in life and diseases. *Experimental Cell Research*, 334(1), 16–25.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.02.016>
- Johnston, L. J., Halliday, G. M., & King, N. J. C. (2000). Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *Journal of Investigative Dermatology*, 114(3), 560–568.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00904.x>
- Kolomeisky, A. B. (2013a). Motor proteins and molecular motors: How to operate machines at the nanoscale. *Journal of Physics Condensed Matter*, 25(46).
<https://doi.org/10.1088/0953-8984/25/46/463101>
- Kolomeisky, A. B. (2013b). Motor proteins and molecular motors: How to operate machines at the nanoscale. *Journal of Physics Condensed Matter*, 25(46).
<https://doi.org/10.1088/0953-8984/25/46/463101>

- Lee, J. W. M., & Ng, M. L. (2004). A nano-view of West Nile virus-induced cellular changes during infection. *Journal of Nanobiotechnology*, 2, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-6>
- Lu, Q., Li, J., Ye, F., & Zhang, M. (2015). Structure of myosin-1c tail bound to calmodulin provides insights into calcium-mediated conformational coupling. *Nature Structural and Molecular Biology*, 22(1), 81–87. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2923>
- Marovich, M., Grouard-Vogel, G. N., Louder, M., Eller, M., Sun, W., Wu, S. J., ... Mascola, J. (2001). Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 6(3), 219–224. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00037.x>
- Martina, B. E. E., Koraka, P., & Osterhaus, A. D. M. E. (2009). Dengue Virus Pathogenesis : an Integrated View. *Cell*, 22(4), 564–581. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-09>
- McConnell, R. E., & Tyska, M. J. (2010). Leveraging the membrane - cytoskeleton interface with myosin-1. *Trends in Cell Biology*, 20(7), 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.04.004>
- Merino-Gracia, J., García-Mayoral, M. F., & Rodríguez-Crespo, I. (2011). The association of viral proteins with host cell dynein components during virus infection. *FEBS Journal*, 278(17), 2997–3011. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08252.x>
- Miklavc, P., & Frick, M. (2020). Actin and Myosin in Non-Neuronal Exocytosis. *Cells*, 9(6), 1–18. <https://doi.org/10.3390/cells9061455>
- Mitchell, M. J., Denais, C., Chan, M. F., Wang, Z., Lammerding, J., & King, M. R. (2015). Lamin A/C deficiency reduces circulating tumor cell resistance to fluid shear stress. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 309(11), C736–C746. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00050.2015>
- Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D. A., Panetta, A. K., Sester, D. P., Liu, L., ... Young, P. R. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Science Translational Medicine*, 7(304). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3863>
- Nickaen, M., Berro, J., Pollard, T. D., & Slepchenko, B. M. (2019). Actin assembly produces sufficient forces for endocytosis in yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 30(16), 2014–2024. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-01-0059>
- Papadopulos, A. (2017). Membrane shaping by actin and myosin during regulated exocytosis. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 84, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.05.006>
- Peter, A., & Stick, R. (2015). Evolutionary aspects in intermediate filament proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 48–55.

<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.12.009>

- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2012). Degrees of maturity: The complex structure and biology of flaviviruses. *Current Opinion in Virology*, 2(2), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.02.011>
- Puerta-Guardo, H., Glasner, D. R., & Harris, E. (2016). Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathogens*, 12(7), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005738>
- Radtke, K., Döhner, K., & Sodeik, B. (2006). Viral interactions with the cytoskeleton: A hitchhiker's guide to the cell. *Cellular Microbiology*, 8(3), 387–400. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00679.x>
- Ramirez, R. R., & Ludert, E. (2019). *crossm from Mosquito Cells in Association with the Intracellular Cholesterol Transporter Chaperone Caveolin Complex*. 93(4), 1–25.
- Reck-Peterson, S. L., Redwine, W. B., Vale, R. D., & Carter, A. P. (2018). The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 382–398. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0004-3>
- Scaturro, P., Cortese, M., Chatel-Chaix, L., Fischl, W., & Bartenschlager, R. (2015). Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS Pathogens*, 11(11), 1–32. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005277>
- Schnapp, B. J., & Reese, T. S. (1989). Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(5), 1548–1552. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.5.1548>
- Shrivastava, N., Sripada, S., Kaur, J., Shah, P. S., & Cecilia, D. (2011). Insights into the internalization and retrograde trafficking of dengue 2 virus in BHK-21 cells. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025229>
- Svitkina, T. (2018). The actin cytoskeleton and actin-based motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1), 1–21. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018267>
- Tan, C. H., Wong, P. S. J., Li, M. Z. I., Vythilingam, I., & Ng, L. C. (2011). Evaluation of the Dengue NS1 Ag strip® for detection of Dengue virus antigen in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(6), 789–792. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0028>
- Taylor, M. P., Koyuncu, O. O., & Enquist, L. W. (2011). Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 427–439. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2574>
- Teo, C. S. H., & Chu, J. J. H. (2014). Cellular Vimentin Regulates Construction of Dengue Virus Replication Complexes through Interaction with NS4A Protein.

- Journal of Virology*, 88(4), 1897–1913. <https://doi.org/10.1128/jvi.01249-13>
- Tran, D. T., & Ten Hagen, K. G. (2017). Real-time insights into regulated exocytosis. *Journal of Cell Science*, 130(8), 1355–1363. <https://doi.org/10.1242/jcs.193425>
- Turgay, Y., & Medalia, O. (2017). The structure of lamin filaments in somatic cells as revealed by cryo-electron tomography. *Nucleus*, 8(5), 475–481. <https://doi.org/10.1080/19491034.2017.1337622>
- Vale, R. D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, 112(4), 467–480. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00111-9)
- Waggoner, J. J., Gresh, L., Vargas, M. J., Ballesteros, G., Tellez, Y., Soda, K. J., ... Pinsky, B. A. (2016). Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63(12), 1584–1590. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw589>
- Wang, J. L., Zhang, J. L., Chen, W., Xu, X. F., Gao, N., Fan, D. Y., & An, J. (2010). Roles of small GTPase Rac1 in the regulation of actin cytoskeleton during dengue virus infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000809>
- Ward, B. M. (2011). The taking of the cytoskeleton one two three: How viruses utilize the cytoskeleton during egress. *Virology*, 411(2), 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.024>
- Watterson, D., Modhiran, N., & Young, P. R. (2016). The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Research*, 130, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.02.014>
- Yang, J., Zou, L., Hu, Z., Chen, W., Zhang, J., Zhu, J., ... Rao, X. (2013). Identification and characterization of a 43 kDa actin protein involved in the DENV-2 binding and infection of ECV304 cells. *Microbes and Infection*, 15(4), 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.01.004>
- Yu, I. M., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., ... Chen, J. (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*, 319(5871), 1834–1837. <https://doi.org/10.1126/science.1153264>
- Zamudio-Meza, H., Castillo-Alvarez, A., González-Bonilla, C., & Meza, I. (2009). Cross-talk between Rac1 and Cdc42 GTPases regulates formation of filopodia required for dengue virus type-2 entry into HMEC-1 cells. *Journal of General Virology*, 90(12), 2902–2911. <https://doi.org/10.1099/vir.0.014159-0>